



Genoma España  
*Sector agroalimentario*

# Tecnologías Moleculares de Trazabilidad Alimentaria

## Informe de Vigilancia Tecnológica



# Tecnologías Moleculares de Trazabilidad Alimentaria

Informe de Vigilancia  
Tecnológica



Genoma España  
*Sector agroalimentario*

## TECNOLOGÍAS MOLECULARES DE TRAZABILIDAD ALIMENTARIA

El presente informe de Vigilancia Tecnológica ha sido realizado en el marco del convenio de colaboración conjunta entre Genoma España y la Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid (FGUAM), entidad que gestiona el Círculo de Innovación en Biotecnología (CIBT), perteneciente al Sistema de Promoción Regional de la Innovación MADRID+D.

Los autores de este informe agradecen la colaboración ofrecida por toda la comunidad científica y empresarial para la realización de este informe, en especial a:

- Dr. Ricardo Pérez-Martín, Dra. Carmen G. Sotelo [Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Química y Tecnología de Productos Marinos].
- Dra. María del Rosario Martín de Santos, Dra. Teresa García Lacarra (Universidad Complutense de Madrid. Facultad de veterinaria. Dpto. Nutrición y Bromatología III).
- Dra. Ana Sanz Herrero, Dr. Juan Ramón Rodríguez (Bionostra).
- Raquel Cuéllar, Dr. Pedro M. Franco de Sarabia, Ana Arraztio (Biotools).

La reproducción parcial de este informe está autorizada bajo la premisa de incluir referencia al mismo, indicando: Tecnologías Moleculares de Trazabilidad Alimentaria, Informe de Vigilancia Tecnológica. GENOMA ESPAÑA/ CIBT-FGUAM.

Genoma España no se hace responsable del uso que se realice de la información contenida en esta publicación. Las opiniones que aparecen en este informe corresponden a los expertos consultados y a los autores del mismo.

© Copyright: Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica/Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid.

Autores: Marta López (CIBT-FGUAM)  
Paloma Mallorquín (CIBT-FGUAM)  
Miguel Vega (Genoma España)

Edición: Silvia Enríquez (Genoma España)

Referencia: GEN-ES03001

Fecha: Abril 2003

Depósito Legal: M-20108-2003

ISBN: 84-607-7334-5

Diseño y realización: Spainfo, S.A.

# Índice de contenido

• RESUMEN EJECUTIVO	7
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
<b>2. DEFINICIÓN Y CONCEPTO DE TRAZABILIDAD</b>	<b>9</b>
<b>3. COMPUESTOS A TRAZAR</b>	<b>11</b>
<b>4. TECNOLOGÍAS Y APLICACIONES</b>	<b>12</b>
4.1. Métodos de análisis basados en la detección de proteínas.	12
4.1.1. ELISA.	12
4.1.2. Western Blot.	17
4.1.3. Otras técnicas: Isoelectroenfoque.	18
4.2. Métodos de análisis basados en la detección de ADN.	19
4.2.1. Métodos de análisis basados en hibridación de ADN: Southern Blot.	21
4.2.2. Métodos de análisis basados en la reacción de la PCR.	22
4.2.3. Aplicaciones de la PCR en trazabilidad alimentaria.	28
<b>5. TECNOLOGÍAS Y PRODUCTOS EMERGENTES</b>	<b>35</b>
5.1. Detección de variedades cruzadas de OMGs.	35
5.2. Microarrays y biochips de ADN.	35
5.3. Detección de animales clónicos de granja.	37
5.4. Métodos en "tubo cerrado" y marcaje por fluorescencia.	38
<b>6. NORMATIVA EUROPEA SOBRE TRAZABILIDAD ALIMENTARIA</b>	<b>40</b>
6.1. Normativa relativa al etiquetado de OMGs.	41
6.2. Legislación Europea sobre etiquetado de vacuno.	45
6.3. Legislación Española y Europea sobre etiquetado de pescado.	46

<b>7. EMPRESAS RELACIONADAS CON LA TRAZABILIDAD ALIMENTARIA QUE OPERAN EN TERRITORIO ESPAÑOL</b>	<b>47</b>
7.1. Sistemas Genómicos.	48
7.2. Eurofins Scientific.	50
7.3. IdentiGEN.	53
7.4. Biotools.	53
7.5. Bionostra.	56
7.6. Z.E.U.-Inmunotec.	58
<b>8. TENDENCIAS DE CONSUMO RELACIONADAS CON LA TRAZABILIDAD ALIMENTARIA</b>	<b>59</b>
<b>9. CASOS PRÁCTICOS</b>	<b>60</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>67</b>
• Anexo I: Proyectos de investigación en trazabilidad.	67
• Anexo II: Algunas compañías que comercializan tests de detección de OMGs.	71
• Anexo III: Patentes europeas y estadounidenses relacionadas con trazabilidad.	72
• Anexo IV: Productos transgénicos pendientes de aprobación en la Unión Europea.	75
<b>12. REFERENCIAS</b>	<b>76</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>78</b>

## Resumen ejecutivo

La trazabilidad alimentaria se define como la capacidad de rastrear un alimento desde su origen hasta el consumidor, dando lugar a una identificación fiable de sus ingredientes, un control sanitario, y un seguimiento del alimento durante toda la cadena de producción. La trazabilidad es por tanto una herramienta fundamental al servicio de la calidad alimentaria. Todos aquellos compuestos que forman parte de un alimento serán en consecuencia susceptibles de ser sometidos a un proceso de trazabilidad mediante diversas técnicas.

La detección, identificación y cuantificación de compuestos de origen biológico, presentes en los alimentos, tales como el ADN y las proteínas, es en la actualidad posible mediante tecnologías relacionadas con la Genómica y Proteómica. Aunque las técnicas basadas en el análisis de ADN son las más prometedoras en cuanto a sensibilidad y flexibilidad de condiciones, los métodos de análisis de proteínas representan una opción igualmente válida para cierto tipo de alimentos.

La identificación de especies animales y vegetales, así como la detección y cuantificación de transgénicos, son las dos principales áreas que han sido definidas como fundamentales para el sector alimentario en la actualidad. La Unión Europea ha establecido su propia legislación respecto al etiquetado y trazabilidad de alimentos, desarrollando una normativa específica para la carne de ganado vacuno, productos de la pesca, y Organismos Modificados Genéticamente, la cual debe ser cumplida obligatoriamente por la industria alimentaria.

El número de empresas españolas dedicadas a actividades de trazabilidad alimentaria, mediante técnicas moleculares, es incipiente, debido principalmente al insuficiente interés del sector industrial, que todavía no lo perciben como un valor añadido al producto, y a la ausencia de un procedimiento de certificación homologado, que permita una mayor competitividad de aquellas empresas implicadas.

Sin embargo, la necesidad de cumplir con la normativa, y la creciente demanda por parte del consumidor hacia alimentos que les inspiren confianza, apuntan hacia un interés cada vez mayor por tecnologías que permitan la trazabilidad alimentaria.

# 1. Introducción

En los últimos años, los avances en ingeniería genética de cultivos y animales de granja, el descubrimiento de contaminantes en la cadena alimentaria y la aparición de nuevas enfermedades relacionadas con el consumo de alimentos (Ej. "vacas locas"), han provocado una mayor inquietud por parte de los consumidores. Garantizar la calidad del producto es actualmente un requisito para el consumidor, que exige autenticar el origen y calidad del alimento. Como resultado de esta reciente necesidad el término "trazabilidad" o "rastreadabilidad" de alimentos se ha ido incorporando gradualmente a nuestro vocabulario y se ha convertido en una de las principales preocupaciones de la industria alimentaria. Si bien algunas empresas han convertido esta preocupación en una oportunidad comercial.

La identificación de especies de plantas o animales con fines alimentarios por medio de la observación de características exteriores tales como la forma, tamaño o apariencia, es una tarea difícil y poco fiable. Además, generalmente los alimentos se encuentran procesados o en pequeñas cantidades. Esta situación hace necesario recurrir al uso de análisis a nivel molecular: identificación de proteínas o ADN.

## 2. Definición y concepto de trazabilidad

### ¿Qué es trazabilidad alimentaria?

Una definición muy extendida es la que denomina trazabilidad<sup>1</sup> o rastreabilidad a toda "habilidad utilizada para identificar el origen de un alimento o de sus productos, tan lejos en la secuencia de producción como sea necesario, y realizar un seguimiento del mismo a largo de toda o parte de su vida útil".

Generalmente se usan indistintamente diversos términos para referirse a la trazabilidad, como son la autenticación, certificación de productos, marcas y controles de calidad. No obstante, hay que saber diferenciarlos ya que aunque todos forman parte de un sistema de trazabilidad, no pueden ser considerados sinónimos de la misma.

### TÉRMINOS RELACIONADOS CON LA TRAZABILIDAD

La **certificación** supone una declaración en la que se mantiene que ciertas operaciones se han llevado a cabo en conformidad con las normas ambientales, sociales o relativas a la inocuidad y calidad de los alimentos en cuestión.

La **autenticación** consiste en la identificación de los componentes de un producto y la confirmación de su procedencia.

Las **marcas** suponen la puesta en conocimiento hacia el consumidor de ciertas características de un determinado producto.

Los **controles de calidad** garantizan un compromiso, reconocido por las autoridades correspondientes, sobre la realización de determinadas prácticas y parámetros de calidad aplicados normalmente por productores y comercializadores.

### ¿Qué características posee un alimento que ha sido sometido a un proceso de trazabilidad?

- De origen identificado, así como los diferentes procesos a los que ha sido sometido.
- De mayor calidad y seguridad.
- Original, es decir, sin fraudes tanto de contenido, como de posibles contaminaciones.

### ¿Cuáles son las motivaciones de la trazabilidad alimentaria?

Las dos principales motivaciones son:

- Normativa: las administraciones nacionales y europeas están legislando en materia de trazabilidad y certificación de productos alimentarios, con el fin de asegurar la calidad final del producto que llega al consumidor.
- Fraudes: control de la calidad del material proporcionado por terceros (proveedores) a lo largo de la cadena de producción y distribución de un alimento.
- Sanidad alimentaria: evitar contaminaciones tanto en las materias primas como en las elaboradas.
- Oportunidad comercial: diferenciación del producto por calidad, frente a competidores.

<sup>1</sup> Fernández Andrade, R. (2002). Trazabilidad alimentaria. Una herramienta decisiva para la seguridad y la protección de los consumidores. Distribución y Consumo. 5 Marzo-Abril.

## OBJETIVOS QUE PERSIGUE LA TRAZABILIDAD ALIMENTARIA<sup>2</sup>

- Implementar un sistema de segregación para separar alimentos, lotes o ingredientes alimentarios entre sí. Ejemplo: detección de la presencia de Organismo Modificados Genéticamente<sup>3</sup> (OMGs).
- Implementar un sistema de preservación de la identidad de los alimentos mediante la identificación de la fuente de origen o naturaleza de los alimentos, lotes o ingredientes alimentarios. Ejemplo: autenticación de especies de pescado en alimentos enlatados.

### ¿Cómo se implementa la trazabilidad alimentaria?

Actualmente, en España la trazabilidad ya es ofrecida y garantizada en varios productos, por ejemplo, por diversos sellos o etiquetas de calidad de carne de vacuno, siendo posible conocer de qué animal procede, en qué granja se crió, qué tipo de alimentación recibió, en qué matadero fue sacrificado, qué entidad es la responsable de su comercialización y el establecimiento en el que se vendió<sup>4</sup>. Algo parecido se está empezando a exigir a los productos hortofrutícolas, y cada vez son más las cadenas de distribución que solicitan o exigen a sus proveedores de frutas o verduras la disponibilidad de sistemas de trazabilidad, calidad y certificado.

De esta manera, la trazabilidad se ha convertido en una de las cuestiones prioritarias en la cadena de abastecimiento alimentaria, buscando la seguridad

del consumidor y la satisfacción de sus expectativas de calidad de los productos agrícolas comercializados. En caso de producirse alguna alerta alimentaria, la posibilidad de poder conocer el origen y el circuito de los productos mediante un sistema de trazabilidad permite aumentar la capacidad de determinar con precisión el campo de acción potencial del problema, facilitar la recuperación y retirada de las partidas afectadas, establecer responsabilidades ante cualquier incidente entre los consumidores, y finalmente reducir el impacto económico negativo sobre los integrantes de la cadena comercial. Este será uno de los cometidos de la Agencia Española de Higiene Alimentaria (AESHA)<sup>5</sup>, que supondrá un instrumento esencial para evitar posibles crisis alimentarias.

Además, debemos tener en cuenta que la mejor forma de implantar un sistema de trazabilidad, es mediante la existencia previa de un sistema fiable de certificación, normalmente por lotes.

## TIPOS DE SISTEMAS DE TRAZABILIDAD<sup>6</sup>

- Códigos de barras.
- Tarjetas electrónicas.
- RFTT (Radio Frequency Tags & Transponders, monitorizan el desplazamiento y localización del producto).
- Etiquetas de radio frecuencia.
- VRS (Voice Recognition System).
- Marcadores químicos (sellos o tatuajes con pequeñas cantidades de compuestos químicos).
- Biocoding (marcadores moleculares).

<sup>2</sup> Golan, E.; Krissoff, B.; Kuchler, F. Traceability for food marketing & food safety: what's the next step? *Agricultural Outlook*, Jan-Feb, 2002, 21-25.

<sup>3</sup> Un Organismo Modificado Genéticamente (OMG u organismo transgénico) se caracteriza por contener una fracción de ADN de otro organismo integrado en su propio ADN. Como resultado, el organismo transgénico gana una nueva función generalmente de interés comercial.

<sup>4</sup> Según el reglamento europeo sobre etiquetado y trazabilidad de vacuno y productos de vacuno (Reglamento 1760/2000).

<sup>5</sup> <http://www.msc.es/informacion/organizacionnueva/Textos/Agencia.htm>

<sup>6</sup> Mousavi, A.; Sarhadi, M.; Lenk A.; Fawcett, S. (2002). Tracking and traceability in the meat processing industry: a solution. *British Food Journal*, Vol. 104 nº1, 7-19.

### 3. Compuestos a trazar

La trazabilidad se basa en la detección de todo tipo de ingredientes y posibles contaminantes presentes en alimentos, entre los que podemos destacar los siguientes componentes:

#### RESIDUOS ALIMENTARIOS Y CONTAMINANTES

- Residuos veterinarios (en productos lácteos, piscícolas, avícolas, carnes).
- Agentes carcinogénicos (3-MCPD<sup>7</sup>, acrilamida).
- Micotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas).
- Contaminantes medioambientales (dioxinas, fenoles, furanos, PCBs, PHAs, metales).
- Otros residuos (hormonas, compuestos nitrosos, compuestos químicos procedentes del empaquetado, etilcarbamato, ptalatos).

#### Patógenos

- Bacterias.
- Virus.
- Priones.

#### Organismos Modificados Genéticamente (OMGs)<sup>8</sup>.

**Cualquier** alimento, animal o planta.

La genómica<sup>9</sup> y proteómica<sup>10</sup> permite establecer la trazabilidad de los contaminantes biológicos, patógenos, Organismos Modificados Genéticamente (OMGs o transgénicos), y marcadores específicos de especie.

**El presente informe se centrará en aquellas técnicas basadas en el análisis de ADN y proteínas para la detección de transgénicos, así como la autenticación de especies de consumo habitual.**

<sup>7</sup> 3-monocloropropanodiol.

<sup>8</sup> OMG se refiere a cualquier organismo que ha sufrido una modificación genética (Ej. transgénesis, o silenciamiento de genes, entre otros) por técnicas de biología molecular, para expresar una característica deseada.

<sup>9</sup> Genómica: estudio del conjunto completo de genes de un organismo.

<sup>10</sup> Proteómica: estudio del total de moléculas proteicas presentes en una célula, tejido u órgano.

## 4. Tecnologías y aplicaciones

En primer lugar, se analizarán las distintas técnicas moleculares de detección de proteínas, incluyendo alguno de los métodos fisicoquímicos más relevantes, los cuales son compatibles con las técnicas moleculares. Más adelante se realizará una descripción más detallada de las técnicas de detección basadas en el análisis de ADN, así como nuevos desarrollos y tecnologías.

Las aplicaciones más comunes en el ámbito de la trazabilidad alimentaria se irán comentando a medida que se introduzcan las técnicas utilizadas, ya que la mayoría de ellas son complementarias entre sí y pueden ser utilizadas en más de una aplicación.

### 4.1. Métodos de análisis basados en la detección de proteínas

La detección de proteínas puede realizarse en muestras de alimentos frescos o procesados, siempre y cuando el procesamiento no haya afectado a las proteínas de la muestra. Por este motivo, las técnicas moleculares que suponen el manejo de proteínas son aplicadas en aquellos casos en los cuales se dispone de muestras con un contenido proteico en cantidad suficiente y con la calidad adecuada.

A continuación se describen tres de las tecnologías más utilizadas en el análisis de proteínas para la trazabilidad alimentaria. Mientras que las dos primeras se aplican fundamentalmente para la detección y cuantificación de organismos transgénicos en alimentos no procesados, la última de ellas es usada como método de identificación de especies, fundamentalmente de pescado.

#### 4.1.1. ELISA

Los análisis ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay o ensayo ligado a enzima) detectan o miden la concentración de proteína de

interés en una muestra que puede contener numerosas proteínas distintas. Se utiliza un anticuerpo, fijado a un soporte, que se une específicamente a la proteína diana. Un segundo anticuerpo conjugado a un enzima genera un producto cuyo color es visible al añadir un sustrato determinado, y es fácilmente cuantificable mediante una curva patrón de la proteína de interés.

Frente a las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos (ADN), los análisis ELISA presentan menor sensibilidad y fiabilidad, siendo sin embargo por ello, menos susceptible a originar resultados erróneos (“falsos negativos” y “falsos positivos”). Por otra parte, se necesita desarrollar previamente anticuerpos<sup>11</sup> que reconozcan específicamente la proteína diana que se desea identificar. La única limitación tecnológica para utilizar el método ELISA como análisis rutinario es que se debe de conocer previamente qué proteína concreta se busca en cada caso (por ejemplo, proteínas modificadas o transgénicas<sup>12</sup>), y se deben desarrollar anticuerpos frente a esa proteína. Estas técnicas que permiten cuantificación están limitadas a alimentos no procesados, es decir, no sometidos a tratamientos que hayan podido alterar la mencionada proteína.

<sup>11</sup> Anticuerpo: sustancia defensora (proteína) sintetizada por el sistema inmunológico como respuesta a la presencia de una proteína extraña (antígeno).

<sup>12</sup> Transgénico: animal o planta en el que se ha introducido un gen perteneciente a otra especie. La alteración del contenido genético tiene como objetivo que la especie modificada adquiera unas propiedades que por ella misma no posee. Es el caso, por ejemplo, de determinadas plantas a las que se confiere una mayor resistencia a las plagas mediante genes de otras especies.

**LÍMITES DE DETECCIÓN DE INMUNOENSAYOS**

La concentración habitual de tejido transgénico es de más de 10µg por muestra, y los **límites de detección** de los inmunoensayos pueden predecir la presencia de proteínas modificadas en el orden de un **1% de OMG**<sup>13</sup>.

En el caso de la **identificación de productos cárnicos** mediante ELISA, se han llegado a establecer límites de detección de un **0,9%** para carne de pollo y cerdo, **1%** para carne de ternera y **2%** para carne de cordero, obteniéndose la conclusión de que este método es rápido y preciso para determinar la especie de animal presente en una mezcla de tres o más especies<sup>14</sup>.

Los ensayos de ELISA pueden realizarse mediante diferentes formatos<sup>15</sup>:

**Formato I: Ensayos de laboratorio**

• **Placas multipocillo:**

Suele constar de soportes con 8-12 pocillos, es el más económico y adecuado para análisis cuantitativos a gran escala, proporcionando una alta sensibilidad siempre y cuando las proteínas no se encuentren desnaturalizadas. El tiempo medio necesario para la realización del ensayo es de 90 min. La detección se realiza por medio de dispositivos ópticos. Los límites de detección conseguidos para las proteínas transgénicas de la soja (Ej. CP4 EPSPS) son del 0,25% en el caso de muestras procedentes de semillas, y del 1,4% procedentes de alimentos cocinados<sup>16</sup>.

• **Tubos recubiertos de anticuerpos:**

Son el formato preferido en análisis de campo, requiere un tiempo de entre 15 a 30 min., y permite visualizar los resultados directamente o mediante un lector óptico. Proporcionan resultados cualitativos ya que el ensayo no incluye un estándar que suministre datos cuantitativos con los que comparar los resultados de la muestra.

**Formato II: Ensayos portátiles. Tiras de Detección de Flujo Lateral (LFS)**

• Las Tiras de Detección de Flujo Lateral (LFS, Lateral Flow Strip<sup>11</sup>), son frecuentemente usadas para la detección de proteínas transgénicas, y son comercializadas por distintas empresas estadounidenses<sup>17</sup>.

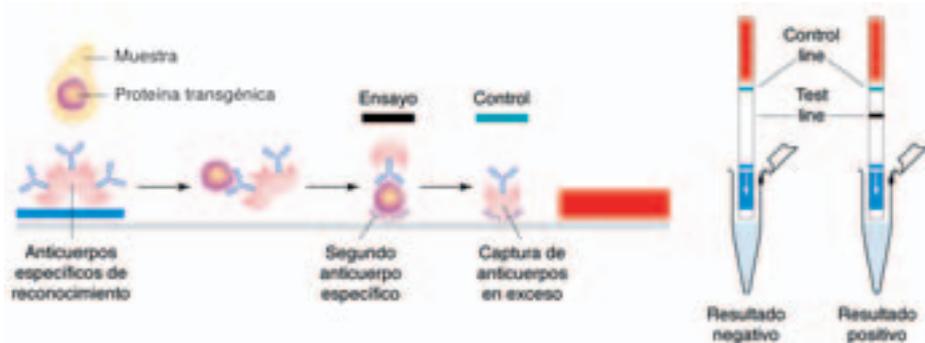


Fig. 1. Esquema de funcionamiento de LFS.<sup>18</sup>

<sup>13</sup> Farid E. Ahmed (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. Vol.20 No.5 May 215-223.  
<sup>14</sup> Smajlovic, M. Reliability of ELISA methods in determining species of meat in heat-treated meat products. Veterinarski arhiv 70 (Suppl.) S67-73, 2000.  
<sup>15</sup> Farid E. Ahmed (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. Vol.20 No.5 May 215-223.  
<sup>16</sup> Yates, K., ed. (1999). Detection Methods for Novel Foods Derived from Genetically Modified Organisms, ILSI Europe polymeric DNA and pedigree relationship in spring barley. Theor. Appl. Genet. 85, 976-984.  
<sup>17</sup> EnviroLogix, Inc., Neogen Corporation, Strategic Diagnostics Inc.  
<sup>18</sup> Farid E. Ahmed (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. Vol.20 No.5 May 215-223.

Estos sistemas se basan en la inmovilización doble de anticuerpos específicos de la proteína a detectar sobre una tira de nitrocelulosa. Este método es de gran utilidad para realizar ensayos en el mismo lugar donde se ha recogido la muestra, es decir, en el punto de inicio de la cadena de producción de alimentos, ya que en sólo 5 o 10 minutos se obtienen resultados visibles. Es una alternativa económica que ya está siendo aplicada de manera comercial para detectar endotoxinas expresadas por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, cuyo gen ha sido incluido en numerosos cultivos para conferir protección frente a insectos<sup>19</sup>.

Sin embargo, actualmente tan sólo existen kits de detección LFS para unas cuantas proteínas transgénicas, aunque se han desarrollado algunos ensayos que son capaces de detectar múltiples proteínas simultáneamente. La mejora del instrumental y de la tecnología de anticuerpos (mayor especificidad) serán las que impulsen el avance de las técnicas de inmunoensayo.

Estos métodos de análisis están diseñados para detectar la presencia de ingredientes modificados

genéticamente mediante la identificación de proteínas transgénicas del maíz (Ej. Cry9C, Cry1Ab y PAT), y de la soja (Ej. CP4 EPSPS). Estos tests proporcionan generalmente resultados cualitativos, al emplear anticuerpos y reactivos incorporados en la tira de flujo lateral. Se venden habitualmente en paquetes de 100 unidades de ensayo a un coste de entre 350€ y 575€, es decir unos 4-6€ por test<sup>20</sup>.

En Estados Unidos, el Servicio Federal de Inspección de Semillas (Federal Grain Inspection Service, FGIS), viene desarrollando desde el año 2001 un programa específico dirigido a la identificación del maíz transgénico StarLink<sup>21</sup> en alimentos destinados al consumo humano<sup>22</sup>. Los métodos elegidos para el análisis de las semillas son tres tipos de LFS y cuatro ensayos basados en la técnica ELISA. Estos tests fueron previamente reconocidos por la Oficina de Normalización de Semillas de Estados Unidos (United States Grain Standards Act, USGSA).

Existen varias empresas que se dedican a comercializar varios kits de detección de OMGs por inmunoensayo.

<sup>19</sup> Lipton, C. R., *et al.* (2000). Guidelines for the validation and use of immunoassays for determining of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. *Food Agric. Immunol.* 12, 153-164.

<sup>20</sup> López Villar, J. GMO Contamination Around the World. Friends of the Earth International (2001).

<sup>21</sup> La producción de la proteína Cry9C deriva de un gen procedente de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Este gen fue insertado en el ADN del maíz resistente a insectos que se vendía antes bajo la marca StarLink por Aventis.

<sup>22</sup> FGIS. Directive 9181.1. 26 de Febrero de 2001. Testing for StarLink Corn-Lateral Flow Test Strip Method.

**EMPRESAS QUE COMERCIALIZAN KITS DE DETECCIÓN DE SEMILLAS TRANSGÉNICAS EN EEUU**

Compañía	Nombre del kit	Proteína a analizar	Sensibilidad	Formato del test
Agdia Inc.	Roundup Ready® ImmunoStrip(TM)	Roundup Ready Protein CP4EPSPS	1/800 semillas de maíz	ELISA-LFS
EnviroLogix Inc.	Cry9C ELISA Plate Kit, High Sensitivity Protocol	StarLink/Cry9C	1/10.000 semillas de maíz	ELISA tradicional
	Cry9C ELISA Plate Kit, Rapid Protocol	StarLink/Cry9C	1/400 semillas de maíz	ELISA tradicional
	QuickStix (TM) Strips for Cry9C (StarLink)	StarLink/Cry9C	1/800 semillas de maíz	ELISA-LFS
	QuickStix (TM) Strips for Roundup Ready® in Soybeans	Roundup Ready® protein,CP4 EPSPS	1/1.000 semillas de soja	ELISA-LFS
	QuickStix (TM) Strips for Roundup Ready® in Corn	Roundup Ready® protein,CP4 EPSPS	1/200 semillas de maíz	ELISA-LFS
Neogen Corporation	Agri-Screen CP4 Strip Test	CP4 EPSPS protein of Roundup Ready soybean and Roundup Ready corn (NK603)	1/800 semillas de maíz 1/1.000 semillas de soja	ELISA-LFS
	Agri-Screen Qualitative Cry9C Test	StarLink/Cry9C	1/800 semillas de maíz	ELISA tradicional
	Agri-Screen Cry9C Strip Test	StarLink/Cry9C	1/800 semillas de maíz	ELISA-LFS
Strategic Diagnostics, Inc.	GMOTM Bt9 Maize Kit	StarLink/Cry9C	1/10.000 semillas de maíz	ELISA tradicional
	GMOQuickTM Bt9 Test Kit	StarLink/Cry9C	1/800 semillas de maíz	ELISA tradicional
	Trait Bt9TM	StarLink/Cry9C	1/800 semillas de maíz	ELISA-LFS
	Trait Bt9TM	StarLink/Cry9C	1/800 semillas de maíz	ELISA-LFS
	Trait Bt9TM	StarLink/Cry9C	1/800 semillas de maíz	ELISA-LFS
	Trait RUR Bulk Soybeans 5-Minute Test Kit	Roundup Ready Soybeans/CP4 EPSPS	1/1.000 semillas de soja	ELISA-LFS
	Trait RUR NK603 Corn Grain 5-Minute Test Kit	Roundup Ready Protein CP4 EPSPS	1/800 semillas de maíz	ELISA-LFS

Tabla 1. Empresas que comercializan Kits de detección de semillas transgénicas en EEUU (LFS = Lateral Flor Strip; ELISA = Ensayo ligado a enzima); Fuente: elaboración propia, según datos ofrecidos por el departamento de inspección de semillas de EEUU (GIBSA, Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration).

La situación en Europa es diferente a la estadounidense ya que todavía se está procediendo a la validación de métodos de detección de OMGs, proceso que coordina el Instituto para la Protección del Consumidor perteneciente al Centro Común de Investigación Europeo de Ispra<sup>23</sup> (Joint Research Centre, JRC). El comité científico de la comisión está formado por expertos en diferentes áreas, y son ellos los encargados de recomendar la validación de aquellos métodos más adecuados para el análisis de OMGs. Sin embargo, hasta el momento tan

sólo un test ELISA tradicional ha sido validado por esta comisión<sup>24</sup>. De hecho, los protocolos que se utilizan son aquellos elaborados por empresas norteamericanas, y validados por la administración estadounidense.

Hasta el momento los protocolos de validación tan sólo han tenido en cuenta semillas liofilizadas, aunque los últimos ensayos ya están incluyendo productos elaborados, así como las últimas tecnologías de detección de transgénicos, que permiten una mayor sensibilidad de detección.

## PROTEÍNAS TRANSGÉNICAS

- Las endotoxinas cry1ab, cry1ac, cry1fa2, cry3a, cry9c tienen como origen genes derivados del *Bacillus thuringiensis*, que confieren resistencia a insectos.
- Las proteínas PAT están producidas por genes procedentes de *Streptomyces hygroscopicus* o *S. viridochromogens*.
- La proteína Bar, proporciona tolerancia al PPT (herbicida denominado Phosphinothricin) y deriva igualmente de *S. hygroscopicus*.
- La proteína CP4 EPSPS se produce en plantas que tienen un gen derivado de *Agrobacterium* sp. strain CP4, gen que ha sido insertado en varias plantas para proporcionarles una tolerancia al herbicida Roundup, entre ellas, la soja, la canola y el algodón. Se aplican distintos dispositivos de tiras de detección según el tipo de planta, semilla o grano y según la cantidad estimada de proteína CP4 EPSPS en las muestras.
- Otras proteínas transgénicas son las glifosato oxidoreductasas, derivadas de *Ochrobactrum anthropi*, confiriendo resistencia a ciertos herbicidas.
- Otras proteínas que confieren resistencia a herbicidas son la acetolactato sintasa, y nitrilasa, proceden de *K. pneumoniae* y *A. thaliana* respectivamente.
- Las proteínas de cubierta vírica CP-PVY, CP-PRSV, CP-CMV, CP-WMY, CP-ZYMV, helicasa, y replicasa, tienen como origen genes derivados de virus específicos de especies vegetales diversas, sobre los que confieren resistencia.
- Las proteínas desaturasa y tioesterasa, provocan cambios en la composición en aceites, producidas por *Umbellularia californica* y *Glycine max*.
- Otras proteínas responsables del retraso en la maduración son aquellas codificadas por los genes samK, acc, accd, PG, producidas por *E. Coli* y *Lycopersicon esculentum*.
- Las proteínas barnase ribonucleasa, inhibidores de la anterior, adenina metilasa, e inhibidores de proteasas, originadas por *B. Amylolyquefaciens* y *E. Coli*, controlan el sistema de polinización.

<sup>23</sup> Joint Research Centre. <http://www.jrc.cec.eu.int>

<sup>24</sup> Innovation in Europe: Research & Results. <http://europa.eu.int/comm/research/success/en/agr/0332e.html>

**Formato III: Últimos desarrollos**

- Otros formatos alternativos son aquellos que utilizan partículas magnéticas sobre la superficie sólida. Estas partículas están recubiertas de anticuerpos de captura y la reacción con las proteínas diana (Ej. transgénicas) tiene lugar en el interior de un tubo. Las partículas que llevan unidas el anticuerpo marcado y la proteína se separan de los anticuerpos y proteínas restantes mediante un imán. La ventaja que proporciona esta técnica es la libertad de las partículas para moverse en la solución, lo que incrementa la precisión del ensayo debido a una mayor uniformidad de las partículas<sup>25</sup>.

- La combinación de diferentes técnicas instrumentales con inmunoensayos es otro ejemplo de alternativa a las tecnologías tradicionales. La espectrometría de masas ha sido empleada en este sentido<sup>17</sup>.

El método ELISA suele ser elegido para analizar la presencia de OMGs en material fresco, semiprocado o procesado, siempre y cuando las proteínas puedan ser detectadas y no estén degradadas. Pese a ser un método de gran sensibilidad, la detección de proteínas en OMGs no es efectivo en el caso de aquellos alimentos derivados de productos transgénicos, como ocurre en el caso del aceite de soja, cuyo contenido en proteínas es prácticamente indetectable.

**4.1.2. Western Blot**

El **Western Blot** es un método altamente específico que suministra información cualitativa necesaria para determinar si una muestra contiene una cantidad de proteína por debajo o por encima de un nivel predeterminado.

Una de las ventajas que presenta la técnica de Western Blot o Inmunoblot consiste en su eficacia en la detección de proteínas insolubles, lo que genera una ventaja adicional en la identificación de especies. Los ensayos por Western Blot se realizan en condiciones desnaturizantes, es decir, condiciones que provocan la ruptura de los enlaces que mantienen la estructura de la proteína, con el fin de evitar estos problemas.

**ESQUEMA DE FUNCIONAMIENTO DE UN WESTERN BLOT**



<sup>25</sup> Brett, G. M., et al. (1999). Design and development of immunoassays for detection of proteins. Food Control 10, 401–406.

<sup>26</sup> SDS (Dodecil Sulfato Sódico).

<sup>27</sup> Geles de poliacrilamida que se transfieren a soportes sólidos (membranas de nitrocelulosa).

<sup>28</sup> Incubación con leche.

<sup>29</sup> Anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra los epítomos antigénicos.

<sup>30</sup> Ponceau, nitrato de plata, Coomassie, o un agente secundario como una enzima.

### 4.1.3. Otras técnicas: Isoelectroenfoque

Otras técnicas tradicionales empleadas para la identificación de especies son electroforesis, isoelectroenfoque y cromatografía líquida, que analizan las proteínas de los alimentos por comparación con los perfiles procedentes de especies auténticas. Las diferencias físico-químicas en carga y tamaño se corresponden con diferencias en movilidad electroforética, puntos isoelectrónicos o tiempos de elusión cromatográfica respectivamente.

De estas tres técnicas, el **Isoelectroenfoque (IEF)** ha despertado gran interés como método para la identificación de especies. Investigadores italianos<sup>31</sup> han realizado un estudio sobre identificación de especies de peces comerciales pertenecientes a los órdenes *Pleuronectiformes* (lenguado, rodaballo) y *Gadiformes* (merluza, bacalao), en el cual se establecen patrones de proteínas sarcoplasmáticas obtenidos mediante técnicas de isoelectroenfoque. Estos patrones han resultado ser especie-específicos<sup>32</sup> y de alta

reproducibilidad, correspondiéndose con 23 especies del orden *Pleuronectiformes* y 20 especies del orden *Gadiformes*. Estas especies de diferentes órdenes poseen un distinto valor comercial e interés en los mercados europeos, por lo que su trazabilidad es esencial para evitar el fraude.

Los métodos de identificación de proteínas (técnicas electroforéticas, cromatografía líquida, inmunoensayos), algunos de ellos incluso de reciente desarrollo<sup>33</sup>, están siendo reemplazados por técnicas basadas en el análisis de ADN, principalmente debido a la degradación que sufren las proteínas tras la muerte del animal, a que su presencia y características dependen del tipo celular, y a que muchas de ellas son termolábiles<sup>34</sup>. Los análisis basados en ADN parecen ser los más adecuados para la identificación de especies, como así lo muestran tanto los trabajos publicados<sup>35</sup> como las recientes patentes<sup>36</sup>. En el caso de la detección de organismos transgénicos, esta se lleva a cabo mediante el análisis de proteínas o de marcadores de ADN dependiendo del coste del ensayo, sensibilidad requerida, y tipo de identificación que se necesita.

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS TÉCNICAS DE INMUNOENSAYO

Cuando las proteínas se desnaturalizan durante el procesamiento del alimento, sucede que los anticuerpos diseñados para reconocer las diferentes especies no reconocen sus antígenos específicos, llegando a dar resultados erróneos. Paralelamente pueden ocurrir **reacciones cruzadas** entre especies estrechamente relacionadas y originar errores tales como falsos positivos.

Otra de las principales desventajas de los inmunoensayos como técnicas de análisis de alimentos es que su precisión puede verse alterada en el caso de alimentos procesados, ya que están formados por **matrices complejas** de proteínas y otros compuestos. Algunas sustancias presentes en estas matrices tales como surfactantes, compuestos fenólicos, ácidos grasos, fosfatasa endógenas y otras enzimas, son capaces de inhibir las interacciones específicas entre el antígeno<sup>37</sup> y el anticuerpo.

Entre sus principales ventajas cabe destacar la **asequibilidad** de la tecnología, y la **alta sensibilidad** que se consigue, con límites de detección que varían entre 0,25% para semillas y el 1% para alimentos cocinados<sup>38</sup>.

<sup>31</sup> Journal of AOAC International Vol. 84 no. 5, 2001.

<sup>32</sup> Patrón único para cada especie.

<sup>33</sup> US2002090663Immunoassay for fish identification (11-07-2002).

WO0242416Immunoassay for fish identification (30-05-2002).

<sup>34</sup> Pierden su estructura tras someterse a altas temperaturas.

<sup>35</sup> Detsch, R. Species identification in meat products treated under different temperatures and heating conditions by means of polymerase chain reaction (PCR) in combination with restriction fragment length polymorphism (RFLP). 45th IcoMST 1999.

<sup>36</sup> WO9839475 A method and system of identification of a meat product by genotyping.

US2002012934 Business method for identification of a meat product by genotyping.

WO0180654 Improving the traceability of meat.

JP2000210085 Identification of animal meat with DNA.

EP0807690Method and compositions for identification of species origin of caviar.

(Información complementaria en el ANEXO IV: Patentes Europeas y estadounidenses relacionadas con trazabilidad).

<sup>37</sup> Cualquier sustancia que, introducida en el organismo, induce a la producción de anticuerpos.

<sup>38</sup> Farid E., Ahmed (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. Vol. 20 No. 5 May 215-223.

## 4.2. Métodos de análisis basados en la detección de ADN

Los métodos analíticos basados en la detección de ADN suelen emplearse cuando el alimento ha sido procesado o bien tratado físicoquímicamente (calor, presión, etc), ya que la proteína puede haberse desnaturalizado o degradado en el proceso, y los métodos analíticos de proteína se ven afectados por estos cambios. El ADN, en cambio, puede haberse fragmentado durante el procesado en trozos pequeños pero ello no implica necesariamente que no puedan ser detectados. Aunque el ADN también se degrada durante la esterilización por calor en el proceso de enlatado de alimentos, todavía es posible obtener pequeños fragmentos con suficientes diferencias de secuencia como para hacer posible la diferenciación entre especies cercanas.

Las **principales técnicas utilizadas para la detección de dianas moleculares** están basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la utilización de Fragmentos de Restricción Polimórficos<sup>39</sup> (RFLP).

### VENTAJAS DE LOS MARCADORES DE ADN FRENTE A LOS MARCADORES PROTEICOS

El ADN es más termoestable que la mayoría de las proteínas, por lo que es menos susceptible a ser degradado durante el procesamiento de los alimentos, aun degradado parcialmente permite identificar diferencias; las técnicas con marcadores de ADN son más sensibles; y por último están presentes en la mayoría de las células de un organismo, y en principio con la misma información independientemente del tejido.

Para la detección de ADN se utilizan dos técnicas, la técnica el **Southern Blot** y la **PCR** (Polymerase Chain Reaction). La primera, Southern Blot, tiene su principal aplicación en la confirmación de resultados obtenidos en la detección de transgénicos<sup>40</sup>. La segunda, PCR, es una técnica muy extendida tanto para la detección de transgénicos como en la identificación de especies.

La principal técnica para la identificación de especies está basada en la amplificación del ADN

diana de la muestra por PCR y una posterior identificación de secuencias específicas de especie, mediante métodos que se explican a continuación. El ADN utilizado en la identificación de especies es generalmente ADN mitocondrial, aunque también se utilizan secuencias de ADN procedentes de genes de la familia de la actina. Ambos tipos de secuencias cumplen con las características necesarias para ser utilizados como indicativos de especie, al estar presentes en todas las especies y presentar una gran variabilidad entre las mismas.

<sup>39</sup> Fragmentos de restricción: trozos de DNA obtenidos mediante cortes generados con enzimas de restricción.

<sup>40</sup> Farid E. Ahmed (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. Vol.20 No.5 May 215-223.

## CARACTERÍSTICAS DE LOS TIPOS DE ADN UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

### *ADN mitocondrial:*

- Más abundante en las preparaciones de ADN total en comparación con el ADN nuclear.
- Posee una alta tasa de mutación<sup>41</sup> que resulta en un cúmulo de mutaciones puntuales que permiten la diferenciación de especies cercanas<sup>42</sup>.
- El ADN mitocondrial tiene un tamaño pequeño.
- Existen varias copias de ADN mitocondrial en la célula.
- Tan sólo posee un alelo y las consiguiente ambigüedades debidas a los genotipos heterocigóticos pueden ser evitadas.
- La secuencia del ADN mitocondrial se conoce para numerosas especies animales.

- El ADN mitocondrial no presenta intrones<sup>43,44</sup>

Las **regiones BMID, BDR y D-loop del citocromo b** presentan mayor variación y son utilizados en análisis de polimorfismos como método de **identificación de especies**<sup>45</sup>.

### *ADN de genes de la familia de la actina*

- Número de copias de la familia multigénica de la actina muy elevado.
- Alto grado de conservación de sus secuencias codificantes, aunque intrones que varían tanto en posición como en tamaño.

Los primers<sup>46</sup> genéricos basados en las secuencias de genes de la familia de la actina se utilizan para

obtener patrones especie-específicos<sup>47</sup>. Se han realizado diversos estudios acerca de la identificación de diferentes especies de ganado, cerdo, oveja, pollo, pavo y caballo<sup>48</sup>.

El ADN utilizado en la detección de transgénicos, vendrá determinado por la secuencia transgénica que se desee identificar, que será indicativa de la presencia de Organismos Modificados Genéticamente en el alimento. Las técnicas empleadas para la detección de transgénicos se basan principalmente en distintas variantes de la PCR, que permiten identificar o cuantificar estas secuencias.

A continuación se procederá a describir las diferentes técnicas de análisis de ADN relacionadas con la trazabilidad alimentaria.

<sup>41</sup> Variación genómica entre individuos de la misma especie. Los invertebrados por lo general tienen unos niveles de diversidad genética superior a la de los vertebrados según confirma la electroforesis de las proteínas.

<sup>42</sup> Distintas variantes de un mismo gen, rasgo u organismo.

<sup>43</sup> Intrón: fragmento no codificante de un gen que no es traducido a proteína.

<sup>44</sup> Mackie, I. M., *et al.* Challenges in the identification of species of canned fish. Trends in Food Science and Technology 10 (1999) 9-14.

<sup>45</sup> Kocher, *et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. (1989) USA 86:6196-6200.

<sup>46</sup> Primer o Cebador: pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN.

<sup>47</sup> Lockley, A. K.; Bardsley, R. G. (2002). Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. Meat Science 61 163 –168.

<sup>48</sup> Lockley, A. K.; Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. Trends in Food Science & Technology 11, 67-77.

### 4.2.1. Métodos de análisis basados en hibridación de ADN: Southern Blot

La técnica Southern Blot consiste en la separación de fragmentos de ADN en geles de agarosa mediante la aplicación de corriente eléctrica, en función del tamaño que posean estos fragmentos. Posteriormente los fragmentos separados son transferidos a membranas de nitrocelulosa o nylon, e incubados con sondas<sup>49</sup> complementarias marcadas que permiten su identificación. De esta forma puede identificarse un fragmento específico de ADN entre toda la población de fragmentos separados por electroforesis.

Esta técnica es aplicada comúnmente como método de análisis de ADN en laboratorios de investigación, ya que permite una detección con elevada sensibilidad. La detección de transgénicos y la identificación de especies es posible mediante esta técnica, aunque generalmente requiere un paso previo en el cual se proceda a la amplificación de la muestra mediante otros métodos que mencionaremos más adelante (PCR). Por esta razón, tan sólo se suele usar en caso de necesitar una confirmación de resultados obtenidos mediante otras técnicas de análisis de ADN, o en caso que se requiera un análisis más detallado. Entre sus desventajas para la trazabilidad de alimentos hay que destacar que se trata de un método muy laborioso, y además necesita una elevada cantidad de muestra.

#### VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL SOUTHERN BLOT

##### ¿Qué ventajas presenta este método?

- La preparación de las sondas no requiere un conocimiento previo de la secuencia del ADN sometido a estudio.
- Aunque esta técnica es puramente cualitativa, se pueden obtener datos cuantitativos mediante el análisis de la intensidad de la señal asociada a la hibridación.

##### ¿Cuáles son sus desventajas principales?

- Es una técnica laboriosa que requiere de cierto tiempo y esfuerzo.
- Por otro lado, tiene las desventajas típicas de los métodos de biología molecular que trabajan con ADN: fenómenos de reactividad cruzada, variabilidades entre secuencias, y además los resultados pueden verse influenciados por factores tales como el tejido de origen de la muestra o la forma en la cual ha sido procesada.

Se ha tenido éxito en la diferenciación de varias especies e incluso de preparados alimentarios procesados, mezclas, y muestras procedentes de animales con diferente crianza.

Ente los recientes avances relativos a esta técnica se debe mencionar la utilización de marcadores fluorescentes con espectros en la

cercanía del infrarrojo, acoplados a grupos reactivos carbamida que se encuentran unidos directamente al ADN. La señal de los marcadores es detectada por dos receptores de infrarrojos<sup>50</sup>, y la reacción de detección tiene lugar en tan sólo 5 minutos, reduciendo por tanto el tiempo total requerido para llevar a cabo la detección.

<sup>49</sup> Pequeños fragmentos de ADN identificativos de especie u OGMs.

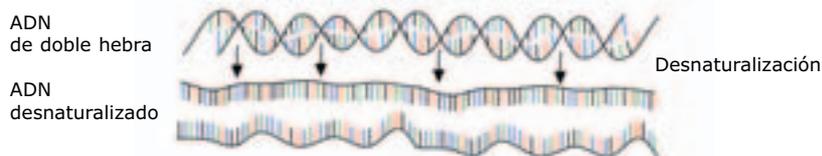
<sup>50</sup> Stull, D. (2001). A feat of fluorescence. Scientist 15, 20–21.

## 4.2.2. Métodos de análisis basados en la reacción de la PCR

El método de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR sirve para amplificar o aumentar la cantidad de ADN que se pretende detectar. La disposición de una cantidad suficiente de ADN es imprescindible para la obtención de resultados fiables.

### La reacción en cadena de la polimerasa o PCR

se basa en la copia de fragmentos de un ADN molde por acción de una polimerasa termoestable (enzima), y requiere la presencia de oligonucleótidos que actúen como cebadores (primers). Los cebadores son fragmentos de ADN de una única hebra cuya secuencia es complementaria de las que enmarca la región que se va a amplificar. La reacción que tiene lugar es cíclica, de modo que las copias obtenidas aumentan de manera exponencial, obteniendo millones de ellas a partir de una cantidad inicial muy pequeña de ADN.



### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

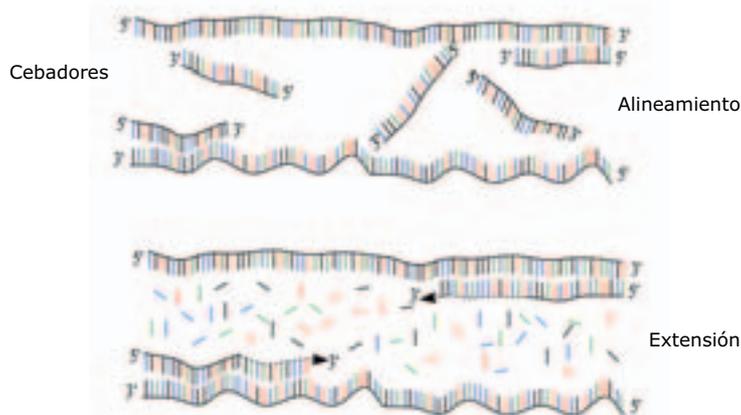


Fig. 2. Esquema general de funcionamiento de la PCR. Fuente: elaboración propia a partir de: Andy Vierstraete. Dept. of Biology, University of Ghent K. L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium (<http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/index.html>).

La elección de los cebadores y del tamaño del fragmento amplificado es de gran importancia para el resultado final. El tamaño del fragmento amplificado debe estar en el rango de 80 a 150 pares de bases de ADN procedente de alimentos procesados, y de 250 pares de bases en el caso de alimentos frescos.

El tipo de primer o cebador que se utilice en la PCR dependerá del tipo de identificación que se requiera. De esta forma, se utilizarán cebadores específicos, es decir, diseñados a partir de una secuencia de ADN conocida previamente y complementarios de la misma, fundamentalmente en la detección de OMGs e identificación de especies. Los cebadores semiespecíficos son

aquellos complementarios de elementos repetitivos de ADN, y tienen su principal aplicación en la detección de especies. Para esta última se emplean así mismo cebadores arbitrarios, que no requieren conocimiento previo de su secuencia de ADN.

Una vez se ha realizado la técnica de la PCR, consiguiendo por tanto una cantidad suficiente de ADN procedente de la muestra, se procede a la identificación de las secuencias mediante gels de agarosa, hibridación con sondas complementarias (reconocimiento), o técnicas de análisis de polimorfismos (comparación de secuencias), también llamadas RFLPS. Estas últimas se utilizan exclusivamente en la identificación de especies.

**COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE PCR MEDIANTE HIBRIDACIÓN Y MEDIANTE ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS (RFLP)**

Técnica	Aplicaciones	Ventajas	Desventajas
PCR + Hibridación	Identificación específica de especies. Detección de transgénicos.	Conocimiento y manejo de la técnica en la mayoría de los laboratorios.	Laboriosa Requiere mucho tiempo Marcaje de la sonda Se requieren grandes cantidades de muestra de ADN.
PCR-RFLP	Identificación específica de especies.	No se requiere tanta cantidad de ADN como en la técnica anterior.	La muestra debe ser libre de contaminantes. Problemas de sensibilidad, que se previenen con uracil-n-glicosilasa.

Tabla 2. Comparación de las técnicas de PCR mediante hibridación y mediante análisis de polimorfismos. Fuente: elaboración propia.

El análisis por PCR puede ser de dos naturalezas, cualitativo (detección de la presencia o ausencia de un fragmento de ADN determinado) o cuantitativo (detección de la cantidad de un fragmento de ADN determinado).

**DETECCIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN EN MUESTRAS DE ALIMENTOS**

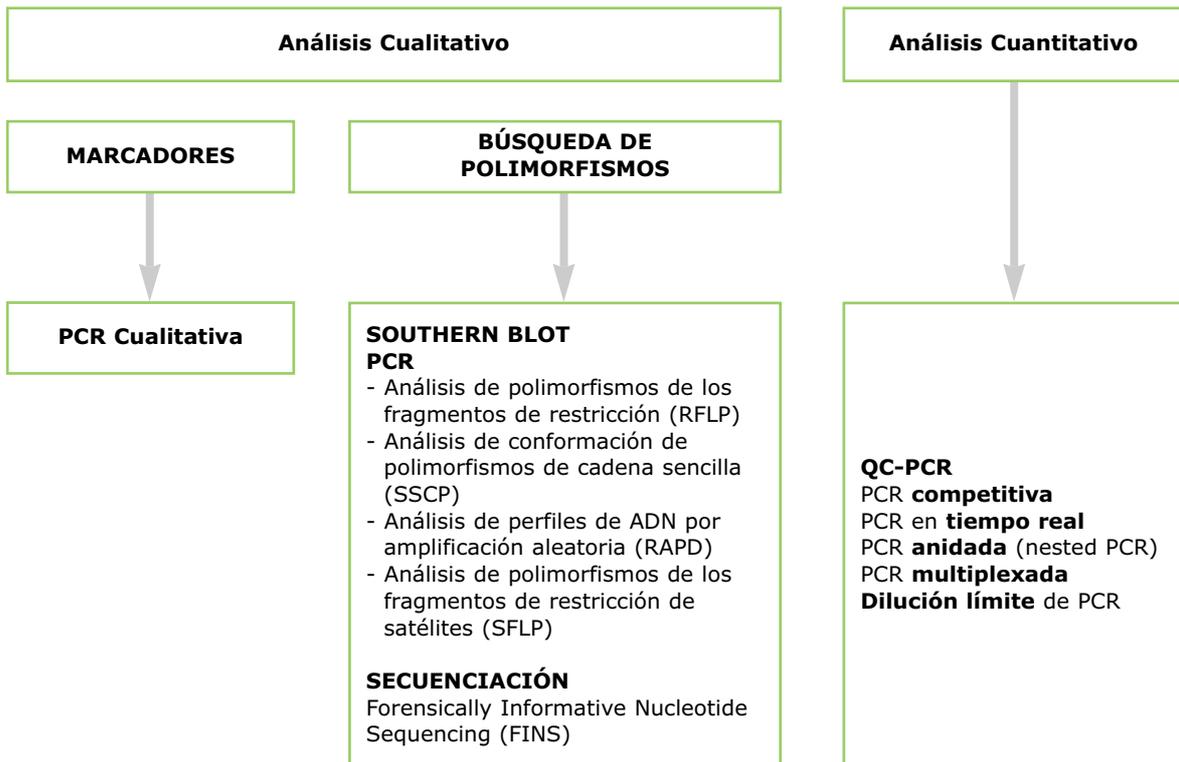


Fig. 3. Estrategias moleculares de detección de fragmentos de ADN en muestras de alimentos: técnicas cualitativas y cuantitativas de ADN por PCR. Fuente: elaboración propia.

## Análisis cualitativo de ADN mediante PCR

Este tipo de análisis de suele realizar cuando tan sólo es necesario conocer la presencia o ausencia de alguna secuencia de ADN, como por ejemplo aquellas secuencias determinantes de especie. Para identificar especies animales o vegetales presentes en alimentos mediante técnicas de análisis del ADN, se pueden seguir dos estrategias, la anteriormente mencionada secuenciación o la búsqueda de polimorfismos entre distintas especies. Asimismo, la detección de OMGs se puede realizar por medio de la detección de fragmentos de ADN indicativos de la transgénesis, como pueden ser promotores o terminadores de ADN, o fragmentos que se solapan entre las anteriores secuencias de ADN.

Las técnicas de identificación de polimorfismos más relevantes se describen brevemente a continuación.

### a) Análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

En esta técnica, el ADN obtenido en la extracción es digerido mediante enzimas de restricción (enzimas que cortan el ácido nucleico en determinados puntos); los fragmentos resultantes se separan mediante electroforesis y se visualizan mediante tinción con bromuro de etidio. Posteriormente, se realiza la transferencia del ADN del gel a una membrana (Southern blotting), normalmente de nailon. El paso siguiente es la hibridación con una sonda, es decir, un fragmento de secuencia conocida marcada mediante radiactividad o quimioluminiscencia. La sonda se une a los fragmentos de ADN fijados en la membrana, que posean una secuencia complementaria, y estos son revelados a través de una autorradiografía.

El análisis de polimorfismos basados en PCR-RFLP presenta la ventaja de no requerir un conocimiento previo de la secuencia de la muestra, como ocurre con los métodos que

emplean secuenciación. Otra ventaja de la técnica PCR-RFLP es que permite la detección de mezclas de especies, resultando ser una herramienta rápida y segura para identificar con precisión no sólo especies, por ejemplo, de atún, sino también especies que presentan una apariencia y textura similar al atún enlatado<sup>51</sup>.

### b) Análisis de conformación de polimorfismos de cadena sencilla (SSCP)

El análisis de ADN mediante SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism Analysis) consiste en la obtención de patrones electroforéticos en función de la estructura tridimensional de los fragmentos de ADN de una sola hebra, que a su vez son dependientes de su secuencia nucleotídica. Esta técnica permite el establecimiento de identidades mediante la comparación de los perfiles de las especies presentes en la muestra, y los de los especímenes auténticos utilizados como patrones.

La técnica PCR-SSCP resulta de especial utilidad para detectar mezclas de especies en muestras de alimentos. Este tipo de análisis se desarrolló en un primer momento para la detección de especies pesqueras<sup>52</sup>, aunque también permite la discriminación entre especies ganaderas<sup>53</sup>. La principal desventaja de esta técnica radica en los problemas de reproducibilidad de los patrones electroforéticos.

### c) Análisis de perfiles de ADN por amplificación aleatoria (RAPD)

La técnica RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) se basa en la utilización de cebadores arbitrarios de pequeño tamaño (unas 10 bases) para realizar la PCR, con lo cual se amplifica cualquier región del genoma flanqueada por secuencias complementarias al cebador y de una longitud adecuada. El número de fragmentos obtenidos es independiente de la complejidad del genoma y se distribuyen arbitrariamente en éste.

<sup>51</sup> Mackie, I. M., *et al.* Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends in Food Science and Technology* 10 (1999) 9-14.

<sup>52</sup> Rehbein, H.; Mackie, I. M.; Pryde, S.; Sotelo, C. G.; Pérez-Martín, R. I.; Quinteiro, J.; Rey-Méndez, M. (1999). Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: Validation by a collaborative study and investigation of inter-species variability of the DNA patterns. *Food Chem* 64(2):263-268.

<sup>53</sup> Weder, J.; Rehbein, H. (2001). On the specificity of tuna-directed primers in PCR-SSCP analysis of fish and meat. *Eur. Food Technol.* 213: 139-144.

Los polimorfismos que se observan son debidos a inserciones y deleciones que alteran la secuencia en uno o los dos puntos de homología con el cebador, y se hacen visibles por la presencia o ausencia de una banda. Como resultado se obtienen patrones electroforéticos con bandas de diferentes tamaños correspondientes a múltiples genes, que forman una huella genética o patrón de tipo fingerprinting. Se ha observado que algunos de estos patrones son específicos de especie, y por tanto pueden ser empleados en la identificación de especies animales y vegetales<sup>54</sup>.

Las ventajas de esta técnica son el poder manejar cebadores universales, su bajo coste, y sencillez debido a que el patrón de bandas es menos complejo que en el caso del análisis por RFLP.

Entre sus inconvenientes se encuentran la baja reproducibilidad de sus resultados y el hecho de que tan sólo es capaz de detectar diferencias en secuencias de ADN, cuando éstas se encuentran en los lugares específicos de reconocimiento de la correspondiente enzima de restricción.

**d) Análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción de satélites (SFLP)**

Esta técnica es similar a la técnica PCR-RFLP, aunque difiere de ésta en el tipo de ADN polimórfico que se analiza. El ADN satélite se localiza en los centrómeros de los cromosomas, y por lo tanto no se trata de ADN mitocondrial, sino de ADN nuclear. Se caracteriza por presentar un número repetido de secuencias variables en su longitud. Dependiendo del número de pares de bases que contengan dichas secuencias, recibirán distinta denominación. Este tipo de polimorfismos se utiliza en la identificación de especies híbridas o altamente homólogas, como ocurre entre la especie bovina y el búfalo, o la oveja y la cabra.

Las técnicas anteriores son las más utilizadas en la identificación de especies con fines de autenticación de alimentos. El tiempo medio necesario para el análisis de una muestra de ADN ronda las 2 horas incluyendo la electroforesis y la tinción. La siguiente tabla muestra las ventajas e inconvenientes más relevantes de las técnicas mencionadas con anterioridad:

**CUADRO COMPARATIVO DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ADN CUALITATIVAS**

	Técnica	Ventajas	Desventajas
Análisis cualitativo de ADN	Secuenciación	Generan gran cantidad de información.	Requiere tiempo e instrumental técnico específico.
	RFLP	Buen manejo y conocimiento de la técnica. Permite la detección de mezclas de especies.	Variación intraespecífica en los sitios de restricción. El procesamiento por calor puede reducir el tamaño de los fragmentos de ADN. Técnica laboriosa.
	SSCP*	Permite la detección de mezclas de especies.	Problemas de reproducibilidad de patrones (las condiciones del análisis afectan a la estructura secundaria de ADN). Variación intraespecífica. Eficiencia dependiente de fragmento.
	RAPD*	Primers universales Menores problemas de variación intraespecífica Bajo coste y sencillez.	Problemas de reproducibilidad de patrones (variabilidad debido al tipo de polimerasa, tamaño del molde de ADN, etc).
	SFLP	Permite distinguir ciertas especies híbridas o con alta homología entre si.	No está diseñada para la identificación múltiple de especies.

Tabla 3. Cuadro comparativo de técnicas de análisis de ADN cualitativas. Fuente: elaboración propia.

\* Ni SSCP o RAPD son técnicas fiables en cuanto a reproducibilidad, aunque en condiciones estables los patrones obtenidos dan resultados suficientes para la identificación de especies.

<sup>54</sup> Lockley, A. K.; Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. Trends in Food Science & Technology 11, 67-77.

**e) FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing)**

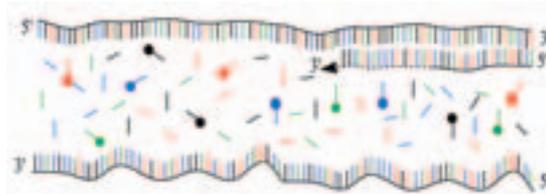
Además de las técnicas mencionadas anteriormente, una de las aplicaciones de PCR consiste en la secuenciación del ADN de muestras biológicas. Esta técnica consta de cuatro etapas, siendo la primera de ellas el aislamiento del material genético presente en la muestra, seguida de una amplificación por PCR de los fragmentos de ADN que se quieran identificar. Esta amplificación se realiza mediante la utilización de marcadores fluorescentes de distinto color, que permiten la identificación de la secuencia nucleotídica. El cuarto paso consiste en un análisis filogenético de las secuencias obtenidas, mediante comparación con secuencias pertenecientes a otras especies.

Esta estrategia ha sido utilizada por centros de investigación españoles como el IIM<sup>55</sup>, con el fin de realizar la identificación de numerosas especies pesqueras de interés comercial en el territorio español. La secuenciación del ADN de la muestra se aplica frecuentemente como método de confirmación posterior a las anteriores técnicas cualitativas por PCR. Según los expertos consultados, en muchos de los casos se consiguen resultados más fiables mediante secuenciación directa.

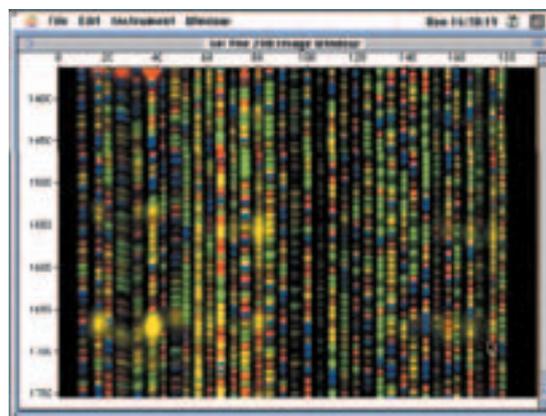
**f) PCR multiplexada (Multiplex PCR)**

Permite la amplificación simultánea de varias secuencias diana con varios cebadores en el mismo tubo. Se trata de un método previo de identificación de especies, y si el resultado es positivo, se somete a cuantificación, es decir, a estimar la cantidad de especie identificada, mediante cualquiera de las siguientes técnicas.

**REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**



**IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS**



Bases de datos



**Identificación de especies mediante análisis filogenéticos**

Fig. 4. Esquema general de funcionamiento de la técnica FINS. Fuente: elaboración propia adaptado de: Vierstraete. Dept. of Biology, University of Ghent K. L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium (<http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/index.html>).

<sup>55</sup> IIM [Instituto de Investigaciones Marinas, Vigo (CSIC); <http://www.iim.csic.es>].

## Análisis cuantitativo de ADN mediante PCR

Este tipo de análisis se realiza cuando interesa cuantificar la cantidad total de una o varias secuencias de ADN presentes en una muestra de alimentos. Es frecuente por tanto la aplicación de la PCR cuantitativa (Q-PCR) en la detección y cuantificación de organismos transgénicos.

- a. La amplificación por **PCR anidada** (Nested-PCR) ofrece más sensibilidad y especificidad, y puede ser útil en casos en que se presuma un bajo porcentaje de OMGs. Este tipo de PCR consiste en la amplificación de una parte de un producto de una reacción de PCR realizada con anterioridad, recurriendo por tanto a una segunda ronda de amplificación.
- b. En la **PCR competitiva** los fragmentos de ADN a identificar son coamplificados conjuntamente con ADN competidor<sup>56</sup>, por lo que ambos competirán por los mismos cebadores. La proporción real de ADN muestra y ADN competidor puede ser estimada estadísticamente a partir de las cantidades obtenidas de ambos productos amplificados.
- c. Otra variante de la PCR cuantitativa es la **dilución límite de PCR**<sup>57</sup>, la cual consigue una cuantificación precisa mediante diluciones de la muestra de ADN a concentraciones conocidas, hasta llegar al punto límite de la dilución. Este punto se corresponde con el umbral de amplificación del ADN, por lo que es posible establecer una correlación con la cantidad de ADN presente en la muestra.
- d. Asimismo se pueden realizar análisis cuantitativos con dispositivos de **PCR en tiempo real**. Esta técnica consiste en la monitorización o medición continua del incremento de los productos amplificados durante la reacción de PCR. Esta modalidad de PCR es de las más utilizadas para la detección de OMGs, ya que permite responder a las necesidades creadas por la reciente normativa europea<sup>58</sup>.

### VENTAJAS DE LA PCR EN TIEMPO REAL FRENTE A LA PCR CONVENCIONAL

La producción de productos de PCR (secuencias de ADN amplificadas) aumenta de manera exponencial, hasta alcanzar una meseta entre los ciclos de amplificación 30 y 40, debido fundamentalmente a que algunos de los componentes de la reacción son limitantes.

En la PCR convencional, los productos de la PCR se miden en distintos puntos de la reacción en cadena, y las concentraciones obtenidas se representan en función de la cantidad de OMG. Por el contrario, en el caso de la PCR en tiempo real, la concentración de ADN se mide en cada ciclo de amplificación, obteniendo así una relación de proporcionalidad entre la concentración de OGM y el número de ciclos de amplificación. La PCR convencional sólo presenta esta proporcionalidad en un rango limitado de concentraciones, perdiendo por tanto parte de su precisión en la cuantificación.

La PCR en tiempo real posibilita además la detección de un número muy bajo de copias de ADN. Existen diferentes cicladores térmicos que automatizan la PCR en tiempo real<sup>59</sup>. La estimación de la concentración de los productos de PCR puede realizarse por medio de diferentes marcadores o técnicas de fluorescencia<sup>60</sup>.

<sup>56</sup> Contiene la misma secuencia complementaria al cebador, y por tanto se obtendrá la amplificación del ADN muestra y ADN competidor.

<sup>57</sup> Farid E. Ahmed (2002). Detection of genetically modified organisms in foods TRENDS in Biotechnology Vol.20 No.5 May

<sup>58</sup> Nivel máximo de contenido en OMGs correspondiente al 1%, considerado como contaminación accidental, por debajo del cual no es obligatorio el etiquetado de los alimentos.

<sup>59</sup> PE Biosystems 7700; <http://www.appliedbiosystems.com/products>

<sup>60</sup> Roche lightcycler; <http://www.roche-mb.com/lightcycler.htm>

## CUADRO COMPARATIVO DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ADN CUANTITATIVAS

	Técnica	Ventajas	Desventajas
Análisis cuantitativo de ADN	PCR anidada	Gran sensibilidad.	Mayor posibilidad de contaminación.
	PCR competitiva	Método cuantitativo (permite identificar y cuantificar el grado de contaminación). Mayores posibilidades de estandarización <sup>61</sup> .	Menor sensibilidad <sup>62</sup> . De uso reciente en agroalimentación.
	Dilución límite de PCR	Gran precisión. No es necesario el uso de un ADN estándar.	Mayor posibilidad de contaminación.
	PCR en tiempo real	Gran precisión en la cuantificación. Alta sensibilidad. La más frecuente en trazabilidad.	Supone un mayor coste que otros métodos cuantitativos por PCR.

Tabla 4. Cuadro comparativo de técnicas de análisis de ADN cuantitativas. Fuente: elaboración propia.

### 4.2.3. Aplicaciones de la PCR en trazabilidad alimentaria

Durante la realización del presente informe se consideró oportuno dedicar una sección independiente al conjunto de posibles aplicaciones de la técnica PCR en la trazabilidad alimentaria, ya que su flexibilidad y mayor complejidad requiere un análisis más detallado.

#### a) Detección de transgénicos

En el anterior apartado dedicado a las tecnologías de análisis de proteínas, ya se mencionó la existencia de varios métodos de detección de proteínas transgénicas en muestras de alimentos. La detección de OMGs mediante la identificación de secuencias de ADN transgénicas, es un método más rápido y específico, aunque más costoso y complicado. En la siguiente tabla se ha realizado una comparación de las técnicas moleculares que permiten la detección de OMGs:

<sup>61</sup> P. Hübner, E.; Studer, J.; Lüthy (1999). Quantitation of genetically modified organisms in food. Nature Biotechnology. Vol 17 Nov.

<sup>62</sup> No obstante, se ha conseguido con este método detectar hasta un mínimo de 0,1% de contenido en ADN procedente de OMGs.

**CUADRO COMPARATIVO DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ADN CUANTITATIVAS**

	Método	Precio orientativo	Tiempo requerido	Resultados	Sensibilidad	Comentarios	Principal uso
Detección de proteínas	Western blot	150€	2 días	Cualitativos	Alta	Laborioso y requiere equipamiento especializado	Investigación
	ELISA	2-3€	30-90 min.	Cuantitativos	Alta	Sencilla pero requiere cierta experiencia y equipamiento	Ensayo de análisis en laboratorio
	Lateral Flow Strip (LFS)	1.5 - 5€	10-20 min.	Cualitativos	Alta	Muy sencilla y no requiere equipamiento especializado	Ensayo de análisis en campo
Detección ADN	PCR <sup>63</sup>	100 - 450€	1-2 días	Cualitativos y cuantitativos	Alta o Muy alta	Requiere experiencia y equipamiento especializado	Ensayo de análisis en laboratorio
	Southern Blot	100 - 320€	6 horas	Cualitativos	Moderada	Requiere experiencia y equipamiento especializado	Ensayo de análisis en laboratorio

Tabla 5. Métodos de detección de OMGs. Fuente: adaptado de, Holm, F., GM Foods. A Flair-Flow Europe synthetic report on EU-sponsored research on genetically-modified foods and gene technologies. (2002) SMEs nº 2; Farid E. Ahmed (2002) Detection of genetically modified organisms in foods. Vol.20 No.5 May 215-223.

La técnica PCR es un método muy sensible para la detección de alimentos transgénicos, ya que puede localizar específicamente cualquier gen de secuencia conocida. En los alimentos transgénicos hay secuencias exógenas, es decir, introducidas

para producir el OMG, que corresponden bien a un promotor, al gen de interés y/o a un terminador. Cualquiera de estas tres secuencias se puede usar como marcador en la detección de alimentos transgénicos.

<sup>63</sup> Datos variables según se utilicen los diferentes tipos de PCR (la mayor sensibilidad a menor coste se obtiene mediante PCR cualitativa, mientras que la PCR en tiempo real proporciona datos en menor tiempo aunque a mayor coste).

Los tests de detección de OMGs mediante PCR se pueden clasificar en cuatro métodos dependiendo del tipo de modificación genética que se desea identificar<sup>64</sup>:

Tipo de test basado en PCR	Características	Secuencias diana	Ventajas	Desventajas
Tests de "Screening" o cribado.	Detección de secuencias frecuentes en variedades de OMGs.	Promotor 35S (CaMV). Terminador nopalina sintasa (NOS).	Adecuado para la detección preliminar de organismos transgénicos.	No discrimina entre OMG y el organismo de procedencia de la secuencia insertada.
Tests de identificación de patrones de elementos insertados.	Detección de distintas combinaciones de elementos insertados.	Distintas combinaciones de elementos insertados.	Generalmente basados en PCR múltiple, reduciendo el número de ensayos necesario.	No discrimina entre distintas variedades con un mismo patrón de elementos transgénicos.
Tests de identificación de eventos transgénicos.	Detección de patrones de inserción de elementos insertados.	Secuencias solapantes entre elementos insertados.	Específicos de cada evento transgénico, distinguiendo entre variedades con similares elementos insertados.	
Tests de identificación y cuantificación.	Detección de cualquier variedad transgénica.	Todas las secuencias insertadas presentes en OMGs.	Un único ensayo.	

Tabla 6. Tipos principales de tests de detección de OMGs. Fuente: elaboración propia

La estrategia a seguir cuando se pretende realizar un análisis de un alimento supuestamente transgénico, comienza generalmente por la realización de un estudio de "screening" o cribado.

Éste consiste en la búsqueda del promotor (p35S) o terminador (NOS) utilizados con mayor frecuencia en transgénicos, sin necesidad de conocer la secuencia específica del gen introducido.

<sup>64</sup> Aarts HJM, van Rie J-PPF & EJ Kok. (2002). Traceability of genetically modified organisms. Review. Expert Rev. Mol. Diagn. 2(1), 69-76.

## DETECCIÓN DE ELEMENTOS GENÉTICOS MODIFICADOS

La mayoría de los OMG presentes en la UE contienen algunos de los siguientes elementos genéticos entre otros:

- Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).
- Terminador de la nopalina sintasa (NOS).
- Marcador genético de resistencia a Kanamicina (nptII).

Los límites de detección de estos elementos genéticos se encuentran en el rango de 20pg a 10ng de ADN diana, lo que supone un porcentaje de 0,0001-1% de la fracción masa de OMG<sup>65</sup>.

Ejemplo: Genescan GMO chip (<http://www.genescan.com>)

La aplicación de técnicas inmunoenzimáticas o basadas en ADN como método de detección de transgénicos requiere unos procesos de optimización técnica y posterior validación del ensayo, mediante materiales de referencia estándares. Estos materiales de referencia deberían idealmente incluir un protocolo de ensayo para cada tipo de alimento (según su procesamiento) y unos patrones de comparación de resultados, para cada tipo de transgénico y su concentración<sup>66</sup>.

No obstante, la validación de los ensayos, con materiales de referencia, es hoy en día uno de los principales temas de preocupación entre los profesionales de la trazabilidad alimentaria. Ya no sólo por la enorme diversidad de productos o mezclas de alimentos existentes<sup>67</sup>, sino por que en el futuro es previsible que existan muchos más tipos de transgénicos de los que existen hoy en día, y por lo tanto, el número de materiales de referencia necesario, se incrementará exponencialmente.

Hasta la fecha tan solo se han desarrollado protocolos validados sobre materiales de referencia estándar<sup>68</sup>, para la detección del promotor p35S y el terminador NOS en semillas de soja y maíz genéticamente modificado. No

obstante, cabe señalar que estos protocolos están más cercanos a la trazabilidad de insumos agrarios (semillas) que de alimentos. Además, existen empresas del sector que ante la falta de materiales de referencia estándar, están desarrollando los suyos propios.

### ¿Con qué problemas podemos encontrarnos en la detección de transgénicos?

El mayor problema que conlleva el uso de ensayos basados en el análisis de ADN o proteínas es que no todos los productos derivados de OMGs contienen una cantidad de ADN o proteínas suficiente para ser detectada (Ej. aceite refinado). Por otro lado, existe una gran dificultad para extraer el ADN de ciertos productos tales como la salsa de soja, lecitina pura o sirope de glucosa, donde puede ser imposible detectar trazas de ADN de interés.

Si el alimento a analizar se encuentra en forma de matriz compleja, durante el proceso de extracción y purificación del ADN es frecuente que ocurra una coprecipitación de compuestos inhibitorios de la enzima (Taq polimerasa) utilizada para amplificar el ADN por PCR, provocando falsos negativos<sup>69</sup>.

<sup>65</sup> Rolf, Mayer. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. Food Control 10 (1999) 391-399.

<sup>66</sup> Lipton, C. R., et al. (2000). Guidelines for the validation and use of immunoassays for determining of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. Food Agric. Immunol. 12, 153-164.

<sup>67</sup> Denominadas como matrices en tecnología de alimentos.

<sup>68</sup> Instituto para Materiales de Referencia y Medidas de la Comisión Europea (Geel, Bélgica).

<sup>69</sup> Bonafini, L.; Heinze, P.; Kay, S.; Van Den Eede, G. Review of GMO detection and quantification techniques. 2002, European Comisión, JRC. Institute of Health and Consumer Protection.

Además, se necesitan materiales de referencia apropiados para realizar los controles positivos y negativos de validación. Estos han de ser independientes del método analítico que se utilice y deben estar enfocados hacia los alimentos frescos o los ingredientes base, en vez de hacia los alimentos procesados. Por otro lado, cada OMG necesita su propio material de referencia, y al contrario que los métodos de detección basados en proteínas, en los cuales un único estándar puede resultar suficiente, los métodos basados en el análisis de ADN suelen precisar la utilización de varias combinaciones de controles positivos.

Por último, es necesario conocer la secuencia de la diana en el ADN muestra (genes alterados o introducidos) para poder diseñar los cebadores o primers. Esto último no resulta un problema significativo en la actualidad, ya que el número de organismos transgénicos autorizados en Europa para su comercialización es bajo, aunque será uno de las principales obstáculos en cuanto este número aumente.

#### **b) Identificación de especies (autenticación)**

Otra aplicación basada en la técnica PCR consiste en la identificación de especies animales o vegetales en alimentos, mediante la identificación de material genético específico de cada especie (especie-específico). Este método permite confirmar la presencia de ADN de una u otra especie en una muestra de alimentos, y se lleva a cabo realizando tantas PCRs selectivas (ADN porcino, ADN bovino, etc.) como se considere conveniente. Las PCRs selectivas que no den resultado en la amplificación y posterior electroforesis indicarán ausencia de material genético de dicha especie, mientras que la obtención de fragmentos amplificados revelará la presencia de la especie correspondiente.

Una vez llevado a cabo el análisis por PCR, los presuntos positivos son usualmente confirmados mediante una verificación que puede ser llevada a cabo, por ejemplo con detección colorimétrica a través de marcadores específicos.

Al ser una técnica muy sensible, existe un riesgo alto de falsos positivos debido a la contaminación. Para evitar que esto suceda, aparte de utilizar controles en todos los análisis, deben de existir en el laboratorio zonas aislada para la realización de las distintas etapas del análisis, así como en la preparación de los distintos reactivos.

#### **Un ejemplo: Productos pesqueros**

En el caso de los productos marinos, la posibilidad de identificar las diferentes especies de pescado es de gran importancia comercial, especialmente cuando las características externas del pescado tales como las aletas, la piel o la cabeza han sido eliminadas y aparecen en forma de conserva, fileteado o ahumado, entre otras. De esta manera, aunque existen distintas técnicas para identificar especies de pescado sin procesar<sup>70,71</sup> éstas no son aplicables a la identificación de especies de pescado que han sufrido un procesado intensivo<sup>72</sup>. La mayoría de los estudios sobre productos procesados están dirigidos a la identificación de especies de atún o salmón<sup>73</sup>.

Las especies de pescado de atún y bonito son de enorme importancia al suponer más de un 4% de la captura mundial de pescado. Al menos 17 especies de pescado de importancia comercial presentan una carne de textura similar a estas especies, particularmente cuando se encuentra enlatada, característica que puede ser empleada para sustituir fraudulentamente a las variedades más valoradas.

<sup>70</sup> Valenzuela, M. A. A comparative study of species identification by gel isoelectrofocusing, two dimensional gel electrophoresis and capillary zone electrophoresis. *J. Cap. Elect. and Microchip Tech* 006:85-91 1999.

<sup>71</sup> Weder, K. P., *et al.* On the specificity of tuna-directed primers in PCR-SSCP analysis of fish and meat. *Eur. Food Res. Technol.* (2001) 213: 139-144.

<sup>72</sup> Hold, G. L.; Russell, V. J.; Pryde, S. E.; Rehbein, H.; Quinteiro, J.; Vidal, R.; Rey-Mendez, M.; Sotelo, C.G.; Pérez-Martín, R.I.; Santos, A.T.; Rosa, C.; Development of a DNA-Based Method aiming at identifying the fish species present in food products. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1175-1179.

<sup>73</sup> Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products. *Eur. Food Res. Technol.* (2001) 212: 385-389.

Nombre científico	Nombre común
Auxis thazard	Melva
Euthynnus affinis	Bonito del Pacífico
Euthynnus alletteratus	Bacoreta
Euthynnus lineatus	Bonito negro
Euthynnus (Katsuwonus) pelamis	Listado
Sarda australis	Bonito Austral
Sarda chiliensis	Bonito Chileno
Sarda orientalis	Bonito del Pacífico
Sarda sarda	Sarda
Thunnus albacares	Rabil
Thunnus alalunga (Thunnus germo)	Albacora
Thunnus atlanticus	Atún de Aleta Negra
Thunnus maccoyii	Atún rojo del Sur
Thunnus obesus	Patudo
Thunnus thynnus orientalis	Atún (Rojo) del Pacífico
Thunnus thynnus thynnus	Atún (Rojo)
Thunnus tonggol	Atún tongol

Tabla 7. Nombres de especies de atún y bonito más relevantes. Fuente: I.M. Mackie *et al.* / Trends in Food Science & Technology 10 (1999) 9-14.

La identificación de especies pesqueras se realiza generalmente mediante técnicas moleculares basadas en el análisis cualitativo por PCR. Estas técnicas han sido descritas anteriormente y su estrategia comprende la búsqueda de marcadores a partir del ADN que ha sido secuenciado y seleccionado previamente, y el análisis posterior de este ADN mediante diferentes técnicas de PCR cualitativa como FINS, SSCP o RFLP.

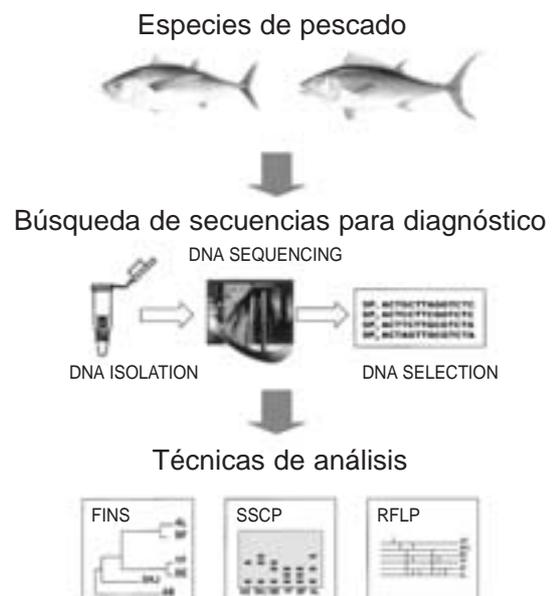


Fig. 5. Estrategias a seguir en el desarrollo de técnicas de identificación de especies de atún. Fuente: Trends in Food Science and Technology 10 (1999) 9-14.

## OTRAS TECNOLOGÍAS DE TRAZABILIDAD ALIMENTARIA

### Cromatografía (GC o HPLC<sup>74</sup>)

Cuando la composición en los ingredientes de un alimento se ve alterada, por ejemplo, debido a la modificación genética, es posible detectar diferencias en su perfil químico. Este método tan sólo es capaz de ofrecer datos cualitativos, y las modificaciones en la composición de sus ingredientes debe ser lo suficientemente significativa como para ser detectada. La cromatografía líquida o de gases ha sido utilizada en este sentido para el análisis de patrones de triglicéridos en distintas variedades de soja<sup>75</sup>.

### Análisis de la proporción de isótopos estables mediante espectrometría de masas

El contenido en nitrógeno <sup>15</sup>N de las muestras de cualquier material biológico puede ser utilizado para determinar la procedencia de alimentos vegetales y animales<sup>76</sup>. La proporción de esa variante (isótopo) del nitrógeno será mayor si el animal ha sido alimentado con proteínas animales que si lo ha sido con proteínas vegetales. La proporción de <sup>15</sup>N-<sup>14</sup>N por ejemplo, tiene valores más elevados en carnívoros que en omnívoros, quien a su vez poseen valores mayores que los herbívoros. Basándose en esta premisa, es posible determinar si un animal de granja ha sido alimentado con piensos procedentes de las categorías anteriormente mencionadas. Del mismo modo, el contenido en <sup>15</sup>N total [<sup>15</sup>N-IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry)] también puede ser utilizado para autenticar alimentos vegetales orgánicos. Los suelos que han sido tratados por fertilizantes tienen una proporción baja de estos isótopos comparada con la de aquellos suelos no tratados, y lo mismo ocurre con las especies vegetales cultivadas en esas tierras. La principal desventaja de esta técnica se encuentra en la imposibilidad de analizar plantas fijadoras de nitrógeno (leguminosas).

### Espectroscopía Infrarroja Cercana o NIR

Esta técnica ha sido utilizada desde hace tiempo en la industria de las semillas al ser una técnica de análisis no destructiva que puede predecir el contenido de humedad, proteína, grasa, fibra y almidón de las semillas. Recientemente ha sido utilizada en la detección de soja transgénica (Roundup Ready<sup>TM</sup>)<sup>77</sup>. La ventaja de este método frente a los vistos anteriormente es su rapidez (1 minuto), no requiere una preparación previa de la muestra, y es un método barato. La principal desventaja es que no permite la identificación de los compuestos, y por lo tanto se necesita una calibración previa para cada OMG. Sin embargo, aunque esta técnica es sensible a la mayoría de los compuestos orgánicos, no permite la detección de cambios en el ADN o en una única proteína. Los cambios que detecta están relacionados con variaciones estructurales significativas, tales como contenidos en lignina o celulosa de las semillas, que han sido introducidas por la presencia de ADN exógeno.

### SNIF-NMR

SNIF-NMR<sup>®</sup> son las siglas de Site-Specific Natural Isotopic Fractionation, técnica que utiliza la resonancia magnética nuclear. Permite al análisis de biomoléculas con gran precisión a nivel atómico, produciendo un patrón atómico distintivo para cada sustancia. Este patrón pasa a formar parte de la base de datos de la compañía que ha desarrollado esta técnica, **Eurofins Scientific**<sup>78</sup>, la cual contiene en la actualidad más de 10.000 perfiles atómicos de compuestos biológicos presentes en la naturaleza. Mediante la comparación de los patrones con el perfil de compuestos analizados, es posible determinar no sólo la identidad de un producto, sino también el método de producción del mismo y en algunos casos su origen geográfico. Este método fue desarrollado inicialmente para la detección de fraudes en la producción de vinos, pero los campos de aplicación se han expandido desde entonces. Actualmente se utiliza en el análisis de piensos, aromatizantes, productos químicos, cosméticos, y farmacéuticos.

<sup>74</sup> GC = Cromatografía de Gases; HPLC = Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

<sup>75</sup> Bonfini, L.; Heinze, P.; Kay, S.; Van den Eede, G. (2001). Review of GMO Detection and Quantification Techniques European Commission, JRC, Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, Italy.

<sup>76</sup> VI International Symposium on Food Authenticity and Safety.

[http://www.eurofins.com/services/fasis/Previous\\_symposia](http://www.eurofins.com/services/fasis/Previous_symposia)

<sup>77</sup> Hurburgh, C.; Roussel, S.; Hardy, C.; Rippke, G. (2002). Detection of Roundup-Ready Soybeans by Near-Infrared Spectroscopy. 93rd AOCS Annual Meeting & Expo Abstracts. Montréal, Québec, Canada, May 5 - 8, 2002.

<sup>78</sup> Eurofins Scientific, <http://www.eurofins.com>

## 5. Tecnologías y productos emergentes

A continuación se describen una serie de tecnologías que se han identificado como emergentes, así como nuevas aplicaciones a las técnicas anteriormente mencionadas en este informe.

### 5.1. Detección de variedades cruzadas de OMGs

En un futuro cercano, la situación de los OMGs pasará a ser mucho más compleja. El número de variedades de OMGs y productos derivados de los mismos irá aumentando exponencialmente, y aparecerá un nuevo tipo de alimento transgénico que contenga varias modificaciones genéticas a la vez. Algunas de estas nuevas subespecies podrían ser consecuencia de la contaminación cruzada<sup>79</sup> debido al uso de maquinarias comunes, o a la polinización natural entre especies vegetales transgénicas y naturales.

### 5.2. Microarrays y biochips de ADN

Serán necesarias por tanto nuevas herramientas moleculares que aseguren la correcta trazabilidad de estos productos. Una de las técnicas más prometedoras en este terreno es el análisis por medio de microarrays<sup>80</sup>, biochips de ADN<sup>81</sup>, o incluso de proteínas, que permitirían la detección de un gran número de marcadores de

transgénesis dentro de un mismo ensayo. Los biosensores serían a largo plazo la herramienta más completa ya que serían capaces de englobar la recogida y el análisis de la muestra en un mismo dispositivo, simplificando y acelerando el proceso de detección de OMGs.

El primer biochip para la detección de OMGs, denominado GMOChip, fue lanzado al mercado al diciembre del 2001 por la multinacional alemana GeneScan Analytics GMBH<sup>82</sup>, y es distribuido por Scil Diagnostics<sup>83</sup>. Este biochip detecta e identifica transgénicos en alimentos frescos, procesados y piensos. La principal ventaja que ofrece este tipo de kits es la integración de los procesos de cribado e identificación en un mismo dispositivo, permitiendo además un total de 14 análisis adicionales para especies vegetales individuales. Este kit se comercializa junto con sus reactivos y un software de análisis denominado Signalys<sup>84</sup>.

Los GMOChips de GeneScan permiten la detección universal de transgénicos siempre que posean los insertos del promotor CaMV 35S, el terminador NOS, y los genes bar y pat. La versión europea del GMOChip detecta aquellas variedades transgénicas aprobadas en Europa (Soja RR, y maíz Maximizer Bt 176, Bt11, Yieldgard Mon810 y Bt-Xtra). Versiones posteriores de este biochip incluyen otras variedades de transgénicos actualmente en proceso de aprobación<sup>85</sup>, o aprobadas por otros países fuera de la Unión Europea.

<sup>79</sup> Aarts HJM, van Rie J-PPF & EJ Kok. (2002). Traceability of genetically modified organisms. Review. Expert Rev. Mol. Diagn. 2(1), 69-76.

<sup>80</sup> Matrices bidimensionales con un elevado número de moléculas ordenadas e inmovilizadas sobre un sustrato sólido.

<sup>81</sup> Colección de ADN consistente en un gran número de moléculas de ADN ordenadas sobre un sustrato sólido de manera que formen una matriz de secuencias en dos dimensiones. López, M., Mallorquín, P., Vega, M. (2002) Informe de Vigilancia Tecnológica: Microarrays y biochips de ADN. CIBT-FGUAM/ Genoma España ([http://www.gen-es.org/02\\_cono/docs/Microarrays.pdf](http://www.gen-es.org/02_cono/docs/Microarrays.pdf)).

<sup>82</sup> GeneScan Analytics GMBH; <http://www.genescan.com>

<sup>83</sup> Scil Gropu; <http://www.scildiagnosics.com>

<sup>84</sup> Lübeck, M. (2002). Detection of genetically modified plants - methods to sample and analyse GMO content in plants and plant products. Ministry of Environment. The Danish Forest and Nature Agency.

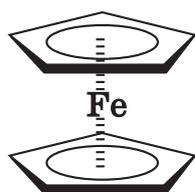
<sup>85</sup> ANEXO IV.

La filial europea de GeneScan ha desarrollado recientemente un dispositivo microelectrónico denominado eSensor™. Este producto se ha desarrollado en colaboración con Clinical Micro Sensors<sup>86</sup>, división de Motorola localizada en California, que ha absorbido las actividades de ciencias de la vida de Motorola.



Fig. 6. Biochip de ADN eSensor™ comercializado por Motorola. Fuente: Motorola eSensor™ DNA Detection System ([http://www.motorola.com/lifesciences/esensor/tech\\_biochips.html](http://www.motorola.com/lifesciences/esensor/tech_biochips.html)).

Se trata de un pequeño circuito electrónico que contiene un conjunto ordenado de electrodos de oro unidos a moléculas de ADN de cadena sencilla, que a su vez se encuentran acopladas a un tipo de compuesto orgánico conductor de electricidad llamado ferroceno.



**ferrocene**

Fig. 7. Molécula de Ferroceno. Fuente: Polimerización por metalocenos. Departamento de Ciencia de Polímeros. Universidad del Sur de Mississippi. <http://www.psrc.usm.edu/spanish/mcene.htm>

Las cadenas de ADN sencilla unidas a cada electrodo, se corresponden con los fragmentos de ADN que se encuentran en las especies vegetales transgénicas. Cuando una secuencia de ADN de la muestra que se desee analizar entre en contacto con su complementaria, estas se unen y provocan el acercamiento de la molécula de ferroceno a la superficie del electrodo. Como consecuencia se produce un cambio en la corriente que pasa por el electrodo, que se puede medir en intensidad para detectar el tipo de ADN que se ha unido, y estimar su cantidad presente en la muestra.

Este dispositivo ya se encuentra disponible para su aplicación en laboratorios, aunque todavía precisa tiempo para ser mejorado y permitir su uso para análisis de campo. Para la realización de este análisis la muestra debe sufrir una serie de pasos previos en los cuales se requiere un tratamiento químico laborioso, y una amplificación del ADN por medio de PCR. Clinical Micro Sensors trabaja en la actualidad en la sustitución de estos pasos previos por medio de tecnologías de microfluidos, que prepararán la muestra y replicarán el ADN de forma automática en aproximadamente una hora.

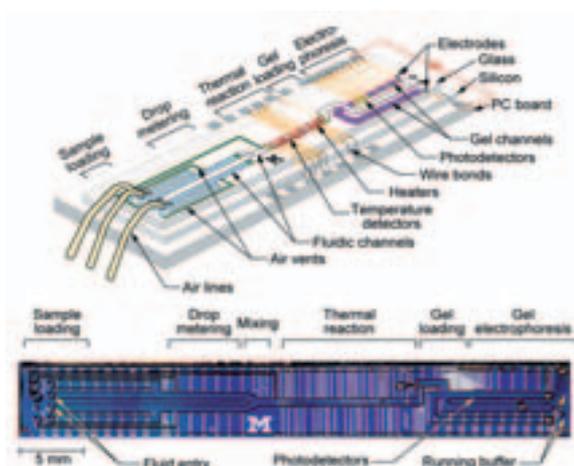


Fig. 8. Dispositivos microelectrónicos Lab-on-a-chip. M.Krishnan, V. Namasivayam, R. Lin, R.Pai, M.A. Burns. Curr. Op. Biotech. 2001, 12, 92-98.

<sup>86</sup> Clinical Micro Sensors; <http://www.microsensor.com>.

La estrategia de futuro de este tipo de análisis consistirá en el diseño de un kit que lleve acoplado un sistema de detección portátil, y que por tanto pudiera ser utilizado en el mismo lugar de recogida de la muestra (análisis in situ). Los biochips de ADN son además capaces de detectar varios tipos de ADN simultáneamente, por lo que una muestra de semillas o alimentos procesados tan sólo sería sometida a un único análisis para analizar múltiples variantes transgénicas.

Para la industria agroalimentaria, la detección de OMGs mediante biochips supone todavía un elevado coste. Por lo tanto, todavía queda un largo camino para que las empresas que están desarrollando estas tecnologías comercialicen sus kits universalmente. Por otro lado, no existen referencias válidas universales que permitan la normalización de protocolos e interpretaciones estadísticas de los datos.

### 5.3. Detección de animales clónicos de granja

La clonación de animales no está regulada por la FDA ya que no se considera una modificación del genoma, como ocurre en el caso de organismos transgénicos, sino una transferencia nuclear del genoma completo del individuo. Este vacío legal será aprovechado por algunas empresas para lanzar al mercado productos derivados de animales clónicos, principalmente carne, leche y sus derivados. La Academia Nacional de las Ciencias ha publicado recientemente un informe<sup>87</sup> en el cual afirma que los alimentos procedentes de animales clónicos no suponen un peligro para la higiene alimentaria, al no ofrecer diferencias sustanciales con los alimentos procedentes del resto de animales. Este documento ha servido a la FDA para pronunciarse sobre la futura incorporación de animales clónicos en la cadena alimentaria, lo que ocurrirá con toda probabilidad el año próximo.

Hasta el momento existen al menos 14 empresas, generalmente ligadas a universidades, en EEUU, Japón, Canadá y Australia dedicadas a ofrecer el servicio de clonación a ganaderos<sup>88</sup>. El número de animales clonados en las granjas americanas es todavía muy bajo, cercano a 100 ejemplares, y todos ellos son animales "de élite" que han supuesto un coste de decenas de miles de euros. Se puede afirmar que la cría de animales clónicos para consumo no resulta atractivo para los ganaderos, ya que un alto porcentaje de los intentos de fecundación resultan infructuosos, encareciendo el proceso, y además los costes de cría podrían ser superiores a los actuales. Los animales descendientes de segunda y sucesivas generaciones serían por tanto los candidatos adecuados para ser utilizados para el consumo.

Los ganaderos estadounidenses que han estado criando vacas clónicas con altos rendimientos de producción de leche, han optado por deshacerse de esta leche por recomendación de la FDA. Entre las funciones de este organismo regulador se encuentra la de garantizar la higiene alimentaria, regulando la salida al mercado de productos para el consumo humano.

La identificación de estos animales clónicos podría convertirse en una futura prioridad para los sistemas de trazabilidad de ganado. Debido a que no se realiza una introducción de elementos genéticos foráneos de otras especies, no es posible diferenciar un clónico de un animal nacido por reproducción tradicional. La estrategia de análisis del ADN no parece por el momento ser la más adecuada, y ya se ha comenzado a sugerir la posible utilidad de algún tipo de análisis de metabolitos específicos o de perfiles proteicos, similares a los realizados en la huella genética. Esta última técnica utiliza una clase de anticuerpos únicos para cada individuo, no asociados a procesos patógenos, que se mantienen estables durante la mayor parte de la vida del animal<sup>89</sup>.

<sup>87</sup> National Academy of Sciences, NAS (<http://www.nas.edu/>).

<sup>88</sup> The Independent, UK. G. Lean. 6 oct. 2002.

<sup>89</sup> Antibody Fingerprinting o Antibody Profile Assay (AbPTM). Idaho National Engineering and Environmental Laboratory; (<http://www.inel.gov/featurestories/3-99barcodes.shtml>).

## 5.4. Métodos en “tubo cerrado” y marcaje por fluorescencia

Otras estrategias que se están desarrollando en la actualidad para mejorar la sensibilidad de los ensayos de ADN son los métodos en “tubo cerrado” y el marcaje por fluorescencia. Los primeros permiten el seguimiento en tiempo real del ensayo con PCR. Como ventaja frente a métodos más tradicionales podemos mencionar la rapidez de obtención de resultados, minimización de potenciales riesgos de contaminación, y facilidad en la recopilación de datos cuantitativos.

El marcaje por fluorescencia ofrece la ventaja de ser más accesible que otras técnicas y permiten la posibilidad de prescindir del análisis electroforético de los productos de PCR. La opción más sencilla consiste en añadir un agente intercalante que se une a cualquier fragmento de ADN doble producido durante el curso de la reacción de amplificación. Otras opciones se utilizan en varios

productos comerciales, aunque por el momento ninguna de ellas ha sido empleada en la autenticación de alimentos en relación a la identificación de especies.

Una alternativa al uso tradicional de la fluorescencia es la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, o tecnología FRET<sup>90</sup>, en la cual se utiliza un atenuador o “quencher” que al encontrarse próximo a un fluoróforo, previene la emisión de fluorescencia<sup>91</sup>. Esta técnica es la que utilizan los productos Amplifluor<sup>TM92</sup>, TaqMan<sup>TM</sup>, Molecular Beacons y Scorpion<sup>TM</sup>, diferenciándose entre ellos en el tipo de sonda utilizada<sup>93</sup>. Un formato alternativo es el que utiliza el LightCycler<sup>TM</sup>, en el cual se utilizan dos sondas marcadas con un fluoróforo aceptor y donante respectivamente, y que emiten fluorescencia cuando se encuentran muy próximas. Esta tecnología se utiliza en varios productos comerciales, aunque por el momento ninguna de ellas ha sido empleada en la autenticación de alimentos en relación a la identificación de especies.

### NUEVOS MÉTODOS DE MARCAJE POR FLUORESCENCIA

Producto	Descripción	Aplicación
Amplifluor	Horquilla con etiqueta fluorescente y molécula quenching.	Detectan la presencia o ausencia de productos de amplificación, aunque no proveen de información acerca de la naturaleza de la molécula detectada.
TaqMan	Sonda que contiene una etiqueta fluorescente y molécula quenching.	Usado en análisis microbiológicos en alimentos.
“Molecular Beacons”	Oligos de cadena sencilla que incorporan una horquilla con una etiqueta fluorescente y molécula quenching.	Usado para la detección de salmonella en alimentos.
Scorpion	Horquilla con una etiqueta fluorescente y molécula quenching, y una extensión complementaria al ADN diana.	
LightCycler	Dos sondas marcadas con un fluoróforo aceptor y donante respectivamente que dirigen la amplificación en dirección contraria.	

Tabla 8. Nuevos métodos de marcaje por fluorescencia. Fuente: elaboración propia, tomado de Lockley, A. K. y Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. Trends in Food Science & Technology 11, 67-7.

<sup>90</sup> Fluorescent Resonance Energy Transfer.

<sup>91</sup> Lockley, A. K.; Bardsley, R.G. (2000). DNA-based methods for food authentication. Trends in Food Science & Technology 11, 67-77.

<sup>92</sup> Detectan la presencia o ausencia de productos de amplificación, aunque no proveen de información acerca de la naturaleza de la molécula detectada.

<sup>93</sup> Ver Tabla 8.

## NUEVOS MÉTODOS DE MARCAJE POR FLUORESCENCIA

### **SYBR Green (agentes que se intercalan en la molécula de DNA)**

Se une preferentemente a DNA de doble cadena. Al unirse al DNA de doble cadena recién sintetizado en cada ciclo, este reactivo emite una fluorescencia cuando se ilumina o irradia con luz o energía electromagnética, proporcional a la concentración de DNA. El producto que se está formando en cada ronda de amplificación puede ser visualizado de forma continua. Permite distinguir fácilmente las señales obtenidas a partir de distintos productos de PCR, unos fragmentos pueden distinguirse de otros a partir de sus distintas temperaturas de fusión.

### **FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer, análisis con sondas de hibridación basado en transferencia de energía por resonancia de fluorescencia)**

Se realiza la hibridación con dos sondas distintas y próximas entre sí, conteniendo una de ellas el fluoróforo donador en su extremo 3' y la otra el fluoróforo aceptor en su extremo 5'. A medida que se incrementa la cantidad de DNA debida al número de ciclos, se incrementa igualmente la cantidad de las dos sondas que hibridarán y darán una señal. La señal FRET será directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR específico. Si el DNA no es específico, no se producirá hibridación de las sondas y por tanto no habrá reacción.

### **Tecnología TaqMan®**

La tecnología Taqman (Applied Biosystems<sup>94</sup>) está basada en la actividad 5' - 3' nucleasa de la Taq Polimerasa y en la utilización de una sonda fluorogénica doblemente marcada. Dicha sonda consiste en un oligonucleótido, complementario a una de las cadenas en la región delimitada por los primers, que lleva unidos un grupo emisor de fluorescencia en su extremo 5' y un grupo apantallador en su extremo 3'. Cuando la sonda está intacta, no hay emisión de fluorescencia. Un incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia, indica que la sonda ha hibridado con su molde específico y ha sido degradada por la actividad exonucleolítica 5' - 3' de la Taq Polimerasa, en su avance para generar producto amplificado. El incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia, está en relación directa con la aparición de producto amplificado específico. Aunque este método es muy sensible, en algunos casos no es posible la detección de ADN en grasas, aceites y otros condimentos.

<sup>94</sup> Tecnología Taqman, Applied Biosystems. [http://www.appliedbiosystems.com/products/productdetail.cfm?prod\\_id=92](http://www.appliedbiosystems.com/products/productdetail.cfm?prod_id=92)

## 6. Normativa Europea sobre trazabilidad alimentaria

Durante 20 años, Europa se ha regido por la llamada regla del 25% a la hora de aplicar la legislación en etiquetado. Por medio de esta pauta, no era necesario etiquetar aquellos ingredientes que no superaran el 25% del contenido total del producto final.

La Directiva europea 2000/13/EC, con fecha del 20 de marzo del 2000, se basa en el principio del etiquetado funcional de los productos alimentarios, con el fin de informar al consumidor de su composición, fabricante, métodos de almacenamiento y preparación, etc. Así mismo, esta directiva permite añadir al etiquetado tanta información como desee el fabricante o producto, siempre y cuando esta sea precisa y no confunda al consumidor. Una corrección posterior de esta normativa prohíbe además toda mención a propiedades curativas o de prevención de cualquier producto alimentario<sup>95</sup>. Algunos alimentos específicos se hallan regulados por medio de legislaciones especiales, como puede ser el caso del chocolate o la carne de vacuno.

El 12 de enero del 2000 se publicó el Libro Blanco sobre Higiene alimentaria<sup>96</sup>, el cual proponía un nuevo marco jurídico basado en el Libro Verde de la

Comisión sobre la legislación alimentaria. Este documento ya reflejaba la propuesta de la Comisión en cuanto a la necesidad de modificar la legislación en materia de etiquetado<sup>97</sup>. El 26 de noviembre del 2001 entró en vigor la Directiva 2001/101/EC, la cual modifica las disposiciones de la directiva 2000/13/EC, entre ellas la norma del 25%, haciendo obligatorio el etiquetado de todos los ingredientes de un producto para el consumo humano. Estas modificaciones pretendían informar a aquellos consumidores que sufrieran de alergias alimentarias, así como detallar del listado de compuestos susceptibles de provocar estas alergias u otras intolerancias.

El Parlamento Europeo ha introducido enmiendas a la última directiva, que serán aprobadas tras una segunda lectura a comienzos del 2003. Los estados miembros dispondrán de un año a partir de esta fecha para poner en marcha las disposiciones de la directiva, tras el cual los fabricantes tendrán otro año de margen para modificar el sistema de etiquetado de sus productos. Si estos plazos se mantienen tal y como se han descrito, se espera que a partir del año 2005 todos los productos destinados al consumo humano estén regulados bajo esta directiva.

### EVOLUCIÓN DE LA LEGISLACIÓN EUROPEA EN MATERIA DE ETIQUETADO DE ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO

Legislación	Propósito
White Paper on food safety COM (1999) 719	Propuestas legislativas en la elaboración de nuevas directivas sobre higiene alimentaria.
Directiva 2000/13/EC	Etiquetado de alimentos destinados al consumo humano.
Directiva 2000/13/EC	Prohibición del etiquetado de ingredientes alimentarios con propiedades preventivas o medicinales.
Directiva 2001/101/EC	Etiquetado obligatorio de todos los ingredientes de productos destinados al consumo humano. Listado de ingredientes potencialmente alergénicos.
En preparación (2003)	Enmiendas a la directiva 2001/101/EC.

Tabla 9. Evolución de la legislación europea en materia de etiquetado de alimentos para consumo humano. Fuente: elaboración propia.

<sup>95</sup> Corrigendum to Directive 2000/13/EC.

<sup>96</sup> European Commission. White Paper on food safety COM (1999) 719, 12th January 2000 [http://europa.eu.int/comm/off/white/com99\\_719.htm](http://europa.eu.int/comm/off/white/com99_719.htm)

<sup>97</sup> Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directive 2000/13/EC as regards indication of the ingredients present in foodstuffs; Brussels, 06.09.2001; COM(2001) 433 final; 2001/0199 (COD).

El Programa Marco (PM) comunitario es el principal instrumento para financiar la investigación en Europa. El VI PM esta plenamente operativo desde el 1 de enero de 2003, con vigencia hasta finales del 2006. Dentro del contexto de preparación del VI programa se procedió durante el año 2002 a la invitación del envío de expresiones de interés<sup>98</sup>, con el fin de identificar las áreas temáticas prioritarias de investigación. El 9% de la respuesta total procedió de organismos españoles, y del total de expresiones de interés, el 8% estaban referidas a la prioridad temática denominada "Calidad y seguridad de los alimentos".

Los métodos de análisis basados en genómica y proteómica aplicados a la trazabilidad alimentaria, para el control de posibles fraudes y verificación de autenticación de etiquetado, tomarán pues un papel relevante a partir del 2005.

## 6.1. Normativa relativa al etiquetado de OMGs

El principal foro internacional para la discusión del etiquetado de alimentos derivados de la biotecnología transgénica, es la Comisión del Codex Alimentario. El Codex implementa el Programa Internacional de Estándares Alimentarios bajo el auspicio conjunto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO).

Con respecto a la regulación de los OMGs, la **Unión Europea** restringe la mayoría de los cultivos modificados genéticamente así como la importación de los mismos, y al mismo tiempo ha creado una legislación obligatoria de etiquetado para todos los alimentos y aditivos procedentes de OMGs.

La normativa europea, a través del Reglamento 1139/98/CE<sup>99</sup>, obliga a etiquetar todos los productos destinados a consumo que se hayan obtenido a partir de vegetales u organismos transgénicos. Estas acciones ya habían sido anunciadas por la Comisión Europea en el Libro Blanco sobre Higiene alimentaria. Mediante la Directiva 49/2000/EEC<sup>101</sup>, si el contenido en transgénicos de un alimento es igual o mayor al 1% de su composición total, cantidad que se considera el umbral mínimo de presencia accidental de ingredientes genéticamente modificados, éste ha de ser etiquetado apropiadamente. El 16 de octubre de 2002 entró en vigor la nueva Directiva 2001/18/EC<sup>102</sup> que regula la liberación intencional en el medio ambiente de organismos genéticamente modificados, y por la que queda derogada la norma anterior (90/220 CEE).

Bajo estas normativas los consumidores europeos además tienen el derecho a demandar a toda empresa que comercialice alimentos transgénicos que no estén debidamente etiquetados. Otros países no integrantes de la Unión Europea también han implantado el etiquetado de OMGs en sus alimentos.

<sup>98</sup> Official Journal of the European Community, nº C71/06.

<sup>99</sup> Council Regulation (EC) No 1139/98 of 26 May 1998 concerning the compulsory indication of the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC.

<sup>100</sup> European Commission. White Paper on food safety COM (1999) 719, 12th January 2000 [http://europa.eu.int/comm/off/white/com99\\_719.htm](http://europa.eu.int/comm/off/white/com99_719.htm)

<sup>101</sup> Commission Regulation (EC) No 49/2000 of 10 January 2000 amending Council Regulation (EC) No 1139/98 concerning the compulsory indication on the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC.

<sup>102</sup> Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. Las principales incorporaciones podrían resumirse en los siguientes once puntos: 1) Retirada progresiva de OMG resistentes a antibióticos antes de 2004 para el supuesto de comercialización y antes de 2008 para el caso de ensayos de campos; 2) Las aprobaciones de los nuevos OMG se realizarán caso a caso; 3) Se instituirá un plan de seguimiento obligatorio en el mercado para los productos que sean o contengan OMG; 4) Los plazos para la autorización de la comercialización serán de 10 años, prorrogables, según las circunstancias; 5) Información en registros públicos; 6) La opinión pública podrá participar en la toma de decisiones; 7) Incorporación de los postulados del Protocolo de Bioseguridad; 8) Para los asuntos que requieran informes específicos sobre la materia se consultará a Comités de ética y asesoramiento científico; 9) Se incorpora el principio de precaución; 10) Se establecen medidas para configurar un sistema de rastreo de productos genéticamente modificados y de su etiquetado; 11) La Comisión Europea se compromete a presentar antes de 2008 una propuesta de regulación de la responsabilidad medioambiental.

En julio el 2001 la Comisión adoptó dos Propuestas que darán lugar a dos nuevos Reglamentos, uno relacionada con la Trazabilidad y Etiquetado de OMGs y productos derivados de éstos<sup>103</sup>, y el segundo en referencia a alimentos y piensos derivados de OMGs<sup>104</sup>.

Desde al año 1998 existe una moratoria de facto, debido a la negativa de varios Estados miembros a comercializar OMGs en su territorio, lo que ha paralizado la aprobación de nuevos transgénicos en Europa. Recientemente, el Parlamento Europeo recomendó a los Estados Miembros en un pleno que tuvo lugar en noviembre del 2002 el levantamiento de esta moratoria.

## EVOLUCIÓN DE LA LEGISLACIÓN EUROPEA EN MATERIA DE ETIQUETADO DE OMGs

Legislación	Propósito
Directiva 90/219/EC	Uso contenido de MMGs <sup>105</sup> .
Directiva 90/220/EC	Liberación al medio ambiente de los OMGs.
Normativa 258/97/EC	Alimentos e ingredientes nuevos.
Normativa 1139/98/EC	Etiquetado de dos OMGs (Soja Roundup Ready, y maíz BT-176).
Normativa 49/2000/EC	Límite 1% OMGs.
Normativa 50/2000/EC	Aditivos y saborizantes derivados de OMGs.
Directiva 18/2001/EC	Liberación deliberada al medio ambiente de los OMGs y su comercialización.
En preparación	Alimentos y piensos modificados genéticamente.
En preparación	Semillas modificadas genéticamente.

Tabla 10. Evolución de la legislación europea en materia de etiquetado de OMGs  
Fuente: Adaptado de ILSI Europe Novel Food Task Force<sup>106</sup>

Una cuestión a tener en cuenta es el hecho de que queda excluido de la obligatoriedad en el etiquetado todos aquellos alimentos donde no pueda encontrarse el ADN o proteínas transgénicas, aunque utilicen en su composición componentes provenientes de OMGs como

lecitinas o aceites y grasas vegetales. Así mismo, aquellos ingredientes clasificados en la industria alimentaria como aditivos de alimentos, saborizantes de alimentos y disolventes utilizados en la industria del procesado de alimentos, no se encuentran sujetos al etiquetado obligatorio.

<sup>103</sup> Brussels, 25.7.2001 COM(2001) 182 final 2001/0180 (COD) Proposal for a regulation of the european parliament and of the council concerning traceability and labelling of genetically modified organisms and traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC.

<sup>104</sup> Brussels, 25.7.2001 COM(2001) 425 final 2001/0173 (COD) Proposal for a regulation of the european parliament and of the council on genetically modified food and feed.

<sup>105</sup> MMG: microorganismos modificados genéticamente.

<sup>106</sup> Summary Report of A Joint Workshop Held in December 2000. Method Development In Relation To Regulatory Requirements For The Detection Of GMOs In The Food Chain. ILSI Europe Novel Food Task Force, European Commission's Joint Research Centre (JRC) and ILSI International Food Biotechnology Committee Report Series. 2001 International Life Sciences Institute.

El sistema de etiquetado establece además un procedimiento sancionador, a determinar por los Estados Miembros, aplicable en los supuestos de infracción. El marco legal, y en especial el referido procedimiento sancionador, está empujando el desarrollo de nuevos métodos analíticos, basados en la detección de ADN transgénico o bien en la detección de proteína transgénica, que aseguren la veracidad del etiquetado. Estos métodos se encuentran incluidos en los códigos Alemán y Suizo, como métodos oficiales de análisis, pero hoy en día no se dispone de un método publicado como norma oficial.

La Comisión Europea ha puesto en marcha un proyecto para intentar unificar los métodos de detección de OMGs mediante la creación de la Red Europea de Laboratorios de Detección de OMG (ENGL, European Network of GMO Laboratories<sup>107</sup>), coordinada por el centro de investigación europeo Joint Research Centre<sup>108</sup>. Los tres laboratorios españoles que van a participar en estas rondas europeas de análisis son el CNA (Centro Nacional de Alimentación, dependiente de la recién creada Agencia Española de Seguridad Alimentaria), el IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries), y el CNB (Centro Nacional de Biotecnología) perteneciente al CSIC.

Además la Comisión Europea publicó a finales de enero del 2002<sup>109</sup> una recomendación para establecer un programa coordinado para el control de alimentos, en el cual existe un listado de métodos de análisis de ADN y proteínas de OMGs, validados por diferentes organismos internacionales como el JRC (Centro Común de Investigación de la Comisión Europea), la IUPAC (internacional Union of Pure and Applied Chemistry), la AOAC (Association of Analytical Communities) y el CEN (Comité Europeo de Normalización). El listado que se presenta en esta recomendación se reduce a métodos para la detección de maíz y soja transgénica.

En los **Estados Unidos** hasta el momento no hay ninguna ley que obligue a etiquetar los alimentos que contienen OMGs, aunque sí se recomienda el etiquetado voluntario de los alimentos producidos con bioingeniería, y la notificación a la Food and Drug Administration (FDA), de la intención de lanzar al mercado alimentos modificados genéticamente, al menos 120 días antes<sup>110</sup>. En este sentido, el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad (<http://www.biodiv.org>; Convention of Biological Biodiversity) pretende proporcionar la información necesaria para que cada país pueda controlar el comercio e intercambio de productos derivados de OMGs, o prohibir su importación cuando existan dudas acerca de la su seguridad. En Estados Unidos, más del 40% del maíz, 50% del algodón y 45% de la soja plantados en 1999 han sido genéticamente modificados, y al menos un 60% de los productos alimentarios contienen organismos modificados genéticamente (OMGs)<sup>111</sup>. Actualmente ya existen iniciativas de ciertos estados<sup>112</sup>, como el de Oregón, por las cuales será sometido a referéndum el etiquetado de OMGs.

**España** es el único país de la Unión Europea donde se cultiva maíz transgénico. Según un estudio publicado el mes del septiembre de 2002 por la consultora británica Brookes West los cultivos de maíz transgénico ocupan unas 20.000 hectáreas, en su mayoría situadas en Lleida, Girona, Zaragoza y Huesca, lo que representa el 4% de la cosecha total de maíz en España.

En este sentido, y aunque España está sujeta a la legislación europea sobre etiquetado y trazabilidad<sup>113</sup>, hasta la fecha no existe ningún plan nacional de vigilancia y control de transgénicos. A nivel de Comunidades Autónomas, es interesante señalar que la Dirección General de Salud Pública de la Generalitat Valenciana tiene previsto la puesta en marcha de un plan de análisis de alimentos para detectar proteínas o

<sup>107</sup> ENGL, European Network of GMO Laboratories; <http://biotech.jrc.it/engl.htm>

<sup>108</sup> Joint Research Centre; <http://www.jrc.it>

<sup>109</sup> Commission Recommendation of 25 January 2002 concerning a coordinated programme for the official control of foodstuffs for 2002.

<sup>110</sup> Farid E. Ahmed (2002). Detection of genetically modified organisms in foods TRENDS in Biotechnology Vol.20 No.5 May.

<sup>111</sup> Farid E. Ahmed (2002). Detection of genetically modified organisms in foods TRENDS in Biotechnology Vol.20 No.5 May.

<sup>112</sup> <http://www.thecampaign.org>

<sup>113</sup> Directiva 2001/18/EC del Consejo y del Parlamento Europeo, del 12 de marzo del 2001.

## PRODUCTOS TRANSGÉNICOS COMERCIALIZADOS EN LA UNIÓN EUROPEA

Organismo modificado genéticamente (Usos Autorizados)	Empresa	Finalidad de la modificación genética	Decisión Comisión (D.O.C.E.)
Nobi-Porvac Aujeszky Live (Intramuscular)	Vemie Veterinar Chemie	Vacuna Contra Enfermedad de Aujeszky.	18.12.92
RABORAL	Rhone-Merieux	Vacuna Oral Viva contra la rabia en zorros.	19.10.93
Semillas de Tabaco (Cultivo/Industria Tabaquera)	Seita	Tolerancia Bromoxinil.	08.06.94
Nobi-Porvac Aujeszky Live (Intradérmico)	Vemie Veterinar Chemie	Vacuna Contra Enfermedad de Aujeszky.	18.07.94
Semillas de Colza (Producción de Semilla)	Plant Genetic Systems	Tolerancia Glufosinato de Amonio.	06.02.96
Soja (A 5403) (Importación y Procesado)	Monsanto	Tolerancia A Glifosato.	03.04.96
Achicoria (Cultivo)	Bejo Zaden	Andresterilidad/ Tolerancia Glufosinato de Amonio.	20.05.96
Maiz (CG-176) (Todos los Usos)	Ciba-Geigy	Resistencia al Taladro.	23.01.97
Colza (MS1xRF1) (Cultivo)	Plant Genetic Systems	Tolerancia Glufosinato de Amonio.	06.06.97
Colza (MS1xRF2) (Cultivo)	Plant Genetic Systems	Tolerancia Glufosinato de Amonio.	06.06.97
Kit De Análisis (Streptococcus Thermophilus)	Valio Ltd.	Detección de Antibióticos en Leche.	14.07.97
Claveles (Cultivo/ Ornamentación)	Florigene	Cambio de Color.	01.12.97 (Autorización EM)
Colza (Topas 19/2) (Importación y Procesado)	Agrevo	Tolerancia Glufosinato de Amonio.	22.04.98
Maiz (T25) (Todos Los Usos)	Agrevo	Tolerancia Glufosinato de Amonio.	22.04.98
Maiz (MON 810) (Importación y Procesado)	Monsanto	Resistencia al Taladro.	22.04.98
Maiz (Bt-11) (Importación y Procesado)	Northrup King Company	Resistencia al Taladro y Glufosinato de Amonio.	22.04.98
Claveles (Cultivo)	Florigene Europe B.V.	Mayor Longevidad.	20.10.98 (Autorización EM)
Claveles (Cultivo)	Florigene Europe	Cambio de Color.	20.10.98 (Autorización EM)

Tabla 11. Productos Transgénicos Comercializados en la Unión Europea.  
Fuente: Ministerio de Medio Ambiente.

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAs) será probablemente el organismo público encargado de poner en marcha el Plan Nacional de Trazabilidad y Etiquetado de OGMs. Las funciones de esta agencia no están todavía definidas ya que su constitución es reciente, aunque entre sus líneas de actuación se encuentra garantizar la seguridad de los alimentos "desde la granja a la mesa", es decir, la trazabilidad alimentaria.

## 6.2. Legislación Europea sobre etiquetado de vacuno

El movimiento del ganado vacuno y su procedencia ha estado regulado hasta hace poco por medio de normativas propias de cada estado miembro, y la trazabilidad se llevaba a cabo mediante etiquetas tradicionales insertadas en cada animal.

Tras la crisis de la enfermedad de las vacas locas (EEB<sup>114</sup>) de 1996, y en un intento de devolver la confianza a los consumidores, la Unión Europea promulgó legislación que reconociera la importancia del vínculo entre la carne y sus animales de origen. El Reglamento 820/97 original sobre etiquetado de vacuno ha sido revocado y sustituido por el Reglamento 1760/2000<sup>115</sup>. Este Reglamento entró en vigor el 1 de septiembre de 2000, y establece un sistema para la identificación y registro de los animales bovinos, así como para el etiquetado del vacuno y productos de vacuno. Requiere que todo el vacuno y la ternera frescos o

congelados sean etiquetados con un código de referencia que vincule la carne a los animales de origen, el país donde el sacrificio y el despiece tuvieron lugar, y los números de aprobación de los mataderos y las plantas de despiece. Hay una derogación limitada para la carne picada.

El Reglamento 1825/2000<sup>116</sup> del 25 de agosto 2000 determina de forma más detallada las normas que han de seguirse para aplicar el reglamento 1760/2000. La segunda fase de la normativa entró en vigor el 1 de enero de 2002, y requiere que el etiquetado del vacuno indique los países de nacimiento y el país o países de cría, así como todas las indicaciones ya recogidas en la primera fase.

Además debemos tener en cuenta que la modificación a la directiva 2000/13/EC sobre etiquetado, presentación anuncio de ingredientes alimentarios, obligará el etiquetado del contenido de carne procedente del músculo del animal, compuestos grasos y vísceras. La entrada en vigor de esta nueva disposición comenzó el 1 de enero del 2003, aunque los Estados Miembros tendrán de plazo hasta junio del 2003 para ponerla en marcha.

Según los expertos consultados, el cumplimiento de esta legislación, resulta difícil de asegurar, tanto por los operadores cárnicos, ya que muchos de ellos no disponen de sistemas de procesado y etiquetado por lotes (Ej. procedencia), como por las autoridades competentes, que en muchas ocasiones no disponen de procedimientos descritos o analíticas homologadas.

<sup>114</sup> EEB: Encefalopatía Espongiforme Bovina.

<sup>115</sup> Commission Regulation (EC) No 1760/2000 of the European Parliament and of the Council of 17 July 2000 establishing a system for the identification and registration of bovine animals and regarding the labelling of beef and beef products and repealing Council Regulation (EC) No 820/97.

<sup>116</sup> Commission Regulation (EC) No 1825/2000 of 25 August 2000 laying down detailed rules for the application of Regulation (EC) No 1760/2000 of the European Parliament and of the Council as regards the labelling of beef and beef products.

### 6.3. Legislación Española y Europea sobre etiquetado de pescado

En España, el Real Decreto 331/1999 del 26 de febrero, legisla la normalización y tipificación de los productos de la pesca, frescos, refrigerados o cocidos que, entre otras normas, obliga a etiquetar los productos de la pesca y de la acuicultura desde su origen al consumidor. A nivel europeo, el artículo 4 del Reglamento (CE) 104/2000<sup>117</sup>, que entró en vigor el 1 de enero del 2001, permite comercializar únicamente productos pesqueros con una presentación o etiquetado apropiado que indique la denominación comercial de la especie, el método de producción (captura en el mar, en aguas interiores o cría), y la zona de captura o producción. Así mismo, una de las disposiciones que ha tenido que cumplir el Estado Español con el objetivo de cumplir lo previsto en la nueva directiva europea, es la publicación de una lista oficial de denominaciones comerciales para todo el territorio español<sup>118</sup>. Esta lista debe indicar respecto de cada especie su nombre científico, así como su denominación en la lengua oficial, o en aquellas lenguas aceptadas a nivel local o regional.

No obstante, y según los expertos consultados, es complicado el cumplimiento de esta normativa. Las razones que aducen son:

- Confusiones en el etiquetado de especies en origen.
- Falta de ensayos homologados para comprobar la veracidad de productos congelados y procesados.
- Incremento de los costes de producción y distribución por incluir sistemas de trazabilidad, que por otro lado son difíciles de repercutir en el producto final.

Por último citar que el Comité Europeo de Normalización (CEN) ha creado un grupo de trabajo sobre trazabilidad de productos de la pesca, que centrará sus actividades en el etiquetado. Hasta la fecha no se han mencionado métodos, pero ya se ha creado recientemente un primer proyecto llamado TRACEFISH, en donde la Fundación AZTI<sup>119</sup> ostenta la representación española.

<sup>117</sup> Council Regulation (EC) No 104/2000 of 17 december 1999, on the common organisation of the markets in fishery and aquaculture products.

<sup>118</sup> BOE núm. 38, 13 febrero 2002; 5919- 5936.

<sup>119</sup> <http://www.azti.es>

## 7. Empresas relacionadas con la trazabilidad alimentaria que operan en territorio español

La mayoría de las empresas dedicadas al sector de la trazabilidad, han diseñado una estrategia de servicios, dejando para un futuro la posibilidad de introducir en el mercado nuevos desarrollos basados en kits de detección con aplicaciones en la industria alimentaria.

La estrategia de trabajo de las empresas dedicadas a realizar servicios de trazabilidad suele ser parecida. Generalmente formalizan contratos anuales o campañas puntuales con empresas que deciden subcontratar sus servicios. Las grandes superficies como los supermercados suelen ser los clientes principales ya que en los últimos años el aumento de las "marcas blancas", marcas propias de cada cadena de supermercados, ha obligado a estos establecimientos a exigir a sus distribuidores la certificación de origen de los alimentos, así como la ausencia en la mayoría de los casos de alimentos transgénicos. El proceso de análisis de los productos se suele realizar siguiendo las indicaciones exactas de la empresa cliente, es decir, analizando los lotes y alimentos que deseen, o bien en un muestreo al azar de cualquiera de los productos demandados por el cliente. Los resultados de estos análisis no suelen trascender al consumidor final ya que son utilizados por la empresa como control interno de sus productos.

Los alimentos que son sometidos a un mayor número de controles de trazabilidad son aquellos que pueden contener ingredientes derivados de Organismos Modificados Genéticamente, como la soja o el maíz principalmente. El tipo de análisis realizado dependerá del destino final de los alimentos, así por ejemplo, los embutidos como el chopped son unos de los más demandados en cuanto a los análisis de contenido en transgénicos. Los productos susceptibles de fraude son aquellos que son sometidos más frecuentemente a análisis de autenticidad. En relación a posibles adulteraciones, los quesos de oveja suelen verse adulterados por medio de la adición de distintas cantidades de queso de vaca, de un precio mucho

menor. Sin embargo, los alimentos que más sufren de fraude son los pescados, tanto frescos como congelados o procesados, debido a la gran cantidad de especies y el parecido que existe entre ellas. En las carnes procedentes de ganado la sustitución de especies suele deberse en mayor medida a contaminaciones cruzadas que tienen lugar en mataderos o en los lugares de despiece y procesado.

El precio de los análisis moleculares de trazabilidad varía muy poco en las diferentes empresas que ofrecen estos servicios, aunque las empresas consultadas para la realización de este informe tienen un catálogo de precios muy similar. Los análisis más sencillos son los realizados a piensos, para la identificación de OMGs, y pueden costar entorno a 60 y 120 €, mientras que los más complejos son aquellos en los cuales es necesaria la identificación de la especie, con un coste aproximado de 180 €. Lo más laborioso de este tipo de análisis resulta el proceso de purificación, que conlleva un mínimo de dos días. Por comparación con los análisis microbiológicos que se realizan con asiduidad en la industria alimentaria, cuyo coste suele estar entorno a 18 €, los análisis de trazabilidad suponen un coste adicional importante para la industria alimentaria, que además no los consideran como esenciales aunque para realizar el etiquetado de sus productos éstos sean imprescindibles.

Algunas de las empresas dedicadas a ofrecer los servicios de trazabilidad están comenzando a darse cuenta de la importancia que la certificación tendrá en un futuro, por lo que están intentando desarrollar un protocolo adecuado que pueda ser admitido por las organizaciones que actualmente certifican productos o procesos de calidad (ISO, Organización Internacional de Normalización o International Standards Organization). El problema que genera la falta de materiales de referencia es uno de los responsables de que no exista un consenso que permita una certificación a nivel europeo, o incluso nacional.

## ALGUNAS EMPRESAS DE TRAZABILIDAD QUE OPERAN EN ESPAÑA

*Sistemas Genómicos*, España: Kits (Autentigen®) y servicio de autenticación genética de alimentos (secuenciación y electroforesis).

*Eurofins Scientific*, Europa y USA: detección de OMGs, productos lácteos (SNIF-NMR), y trazabilidad de carnes (Eurofins-Tag®).

*IdentiGEN*: detección de OMGs y trazabilidad, TraceBackTM.

*Biotools*: detección de OMGs y composición de carnes en muestras frescas y procesadas.

*Bionostra*: identificación y cuantificación de OMGs. Autenticación de alimentos y determinación de su pureza varietal.

*Z.E.U.-Inmunotec, S.L.*: detección de residuos veterinarios y autenticación de derivados de la leche.

### 7.1. Sistemas Genómicos

Sistemas Genómicos es una compañía valenciana dedicada al análisis agroalimentario y biomédico, para lo que cuenta con una infraestructura completa de secuenciación de ADN. Ofrecen servicios externos de análisis agroalimentario, tanto de autenticación de especies, como de detección de eventos transgénicos en alimentos. Adicionalmente, esta empresa ha desarrollado una serie de kits que comercializa con fines de autenticación de especies tanto en muestras de alimentos como en piensos.

El servicio de "Autenticación genética de alimentos", denominado **AutentiGen®**, mediante análisis de ADN, permite identificar las especies que están presentes en un determinado alimento, en concreto en productos pesqueros y cárnicos. Estos análisis se realizan mediante técnicas de PCR y secuenciación del ADN. Las secuencias obtenidas son comparadas con bases de datos internas de la compañía, así como bases públicas disponibles en GeneBank<sup>120</sup>.

Mediante el servicio de "Análisis de material Transgénico en alimentos", Sistemas Genómicos ofrece a sus clientes la posibilidad de detectar y cuantificar mediante técnicas de PCR la presencia o ausencia de maíz, soja y otras variedades transgénicas. Una de las estrategias que ha seguido Sistemas Genómicos ante la falta de protocolos comunes que permitan una certificación del proceso de análisis, es la participación regular en rondas entre laboratorios internacionales (proficiency tests).

Además de proporcionar a sus clientes un servicio de análisis en agroalimentación, esta compañía ha desarrollado una serie de kits o ensayos destinados a la detección cualitativa de ADN procedente de animales en piensos o alimentos en 4-5 horas. El kit ExtraGEN se utiliza para la extracción de ADN en piensos sometidos a altas temperaturas, mientras que la detección de la presencia o ausencia de especies animales de mamíferos o aves en piensos, correrá a cargo de los kits AutentiGEN®-Mamíferos y AutentiGEN®-Aves respectivamente.

<sup>120</sup> GeneBank, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

**SERVICIOS Y KITS DE ANÁLISIS AGROALIMENTARIO OFRECIDOS POR SISTEMA GENÓMICOS**

Tipo de análisis	Muestra analizada	Especie o sustancia analizada
Autenticación de pescados.	Pescado fresco, congelado, o procesado (conservas, filetes y lomos, ahumados, salazones, harinas de pescado).	Atún y bonito (géneros Thunnus, Katsuwonus, Sarda, Euthynnus, y Auxis).
		Bacalao (permite diferenciar entre bacalao del atlántico y resto de especies).
		Merluza, sardina, anchoa, salmón, trucha, palometa, etc.
Autenticación de carnes.	Productos cárnicos frescos y procesados, siempre de muestras homogéneas <sup>121</sup> .	Pollo, pavo, ganso, vaca, cerdo, oveja, jabalí, pato, caballo, cabra, conejo, perro, gato, rata.
Análisis de material transgénico en alimentos.	Materias primas o alimentos procesados.	Variedades transgénicas de soja y maíz autorizadas en la Unión Europea (Maximizer™, Bt-176, Bt-11, YieldGard™ Mon 810, LibertyLink™ T25, Roundup Ready™, maíz GA21 StarLink™, Roundup Ready™).
Detección cualitativa de la presencia de productos de origen animal en alimentos.	Muestras homogéneas o heterogéneas de alimentos.	Kit AutentiGEN® - Mamíferos Vaca, oveja, cabra, cerdo, jabalí, caballo y ciervos entre otros.
	Piensos simples o compuestos, incluso sometidas a altas temperaturas.	Kit AutentiGEN® - Aves Pollo, pato, avestruz, pavo entre otros.
	Kit ExtraGEN® - Piensos.	

Tabla 12. Servicios y Kits de análisis agroalimentario ofrecidos por Sistema Genómicos.

Fuente: elaboración propia, tomado de <http://www.sistemasgenomicos.com/servicios/agroalimentacion>

<sup>121</sup> En la actualidad se están desarrollando protocolos para la aplicación de análisis sobre muestras heterogéneas.

## 7.2. Eurofins Scientific

Eurofins Scientific<sup>122</sup> es una compañía multinacional dedicada a ofrecer todo tipo de servicios de bioanálisis mediante técnicas de química y biología molecular. Posee una sección dedicada en exclusividad al análisis de alimentos, y subdividida a su vez diferentes secciones, recogidas en la siguiente tabla:

### PRODUCTOS COMERCIALIZADOS Y SERVICIOS OFERTADOS POR EUROFINS SCIENTIFIC

Sección	Muestra analizada	Método de análisis	Nombre del producto
Autenticación.	Todo tipo de sustancias biológicas (alimentos, sustancias aromáticas, cosméticos, medicamentos, etc.).	SNIF-NMR o Site-Specific Natural Isotopic Fractionation.	SNIF-NMR®
Microbiología.	Patógenos (bacterias, virus), hongos y levaduras.	Métodos inmunológicos (VIDA, Vitek Immuno Diagnostic Assay System).  Técnicas moleculares (PCR).	
Química.	Micotoxinas, contenido nutricional, metales, ácidos grasos, edulcorantes, conservantes y otros aditivos, proteínas alérgicas, acrilamida, acetato de medroxiprogesterona.	ELISA, electroforesis, HPLC, etc.	
Biología molecular.	Priones (EEB, Encefalopatía Espongiforme Bovina).	Western Blot.	Prionics Check (desarrollado por la empresa suiza Prionics AG).
	Organismos Modificados Genéticamente (OMGs).	PCR en tiempo real.	GMO Platinum Assay™ (límite de detección del 0.01%). - Cualitativos (35S, TNOS, NPTII). - Cualitativos (Bt11, Bt176, Mon810/YieldGard®, T25/LibertLink™, Roundup Ready®, GA21, CBH351/StarLink™, Mon809, soja AgrEvo). - Cuantitativos (Bt11, Bt176, Mon810/Yieldgard, T25/Libert Link™ Round'Up Ready®, y cuantificación general con P35S).

<sup>122</sup> Eurofins Scientific: <http://www.eurofins.com>

**PRODUCTOS COMERCIALIZADOS Y SERVICIOS OFERTADOS  
POR EUROFINS SCIENTIFIC**

Sección	Muestra analizada	Método de análisis	Nombre del producto
Biología molecular.	Especies (autenticación).	PCR	Sistemas de detección de trazas de: Cerdo, Vaca, Cabra, Oveja, Burro, Caballo, Avestruz, Pollo, Pavo.
		RFLP	Sistemas de detección distintas especies de: Alce, Ánade, Avestruz, Búfalo, Caballo, Cabra, Canguro, Cerdo, Ciervo, Conejo, Ganado, Gato, Humano, Jabalí, Oveja, Pato, Pavo, Perro, Pollo, Rata, Ratón, Reno.
		ELISA	Sistemas de cuantificación de la presencia de proteínas de: Cerdo, Vaca, Oveja, Aves de granja.
	Ganado vacuno (sistema de trazabilidad).	Análisis de polimorfismos de los fragmentos de restricción de satélites (SFLP).	EUROFINS-TAG®
Alergias por alimentos.	Proteínas presentes en alimentos y secuencias de ADN de sus genes.	ELISA	Sistemas de cuantificación de: Cacahuets, Avellanas, Productos lácteos, Productos derivados de la soja, Cereales y productos derivados.
		PCR o PCR en tiempo real.	

Tabla 13. Productos comercializados y servicios ofertados por Eurofins Scientific.  
Fuente: elaboración propia, tomada de Eurofins Scientific (<http://www.eurofins.com>).

**SNIF-NMR®** son las siglas de Site-Specific Natural Isotopic Fractionation, técnica que utiliza la resonancia magnética nuclear, descrita con anterioridad en el presente informe. La compañía posee actualmente una base de datos propia con patrones de más de 10.000 compuestos biológicos presentes en la naturaleza, entre los cuales se incluyen patrones específicos de distintas especies. Mediante la comparación de los patrones con el perfil de compuestos analizados, es posible determinar no sólo la identidad de un producto, sino también el método de producción del mismo y en algunos casos su origen geográfico.

Este método fue desarrollado inicialmente para la detección de fraudes en la producción de vinos, pero los campos de aplicación se han expandido

desde entonces. Actualmente se utiliza en el análisis de piensos, aromatizantes, productos químicos, cosméticos y farmacéuticos.

La detección de organismos modificados genéticamente es otro de los servicios que ofrece la empresa, utilizando para ello principalmente técnicas de análisis de ADN, aunque también utilizan los métodos inmunológicos basados en ELISAs. El análisis de secuencias transgénicas es realizado mediante los ensayos denominados **GMO Platinum Assay™** por medio de PCR en tiempo real. El aumento de la sensibilidad se consigue por medio de la utilización de sondas más pequeñas, que ofrecen muchas ventajas en la identificación de OMGs en muestras de alimentos muy procesadas.

Los laboratorios europeos de la compañía Eurofins toman parte de las rondas de prueba que organismos independientes del Reino Unido (FSA, Food Standards Agency; FAPAS, Food Analysis Performance Assessment Scheme) están llevando a cabo con el fin de conseguir una serie de protocolos y estándares para la detección de OMGs en alimentos de consumo humano y animal.

Con respecto a la identificación de especies y trazabilidad desde el origen, Eurofins ha desarrollado un sistema denominado **Eurofins Tag**® capaz de realizar el seguimiento del animal desde la granja hasta el punto de venta. La tecnología se basa en el análisis de la huella genética de cada animal, los ya mencionados con anterioridad microsatélites (regiones hipervariables dispersas por todo el genoma). Eurofins utiliza un conjunto de 11 microsatélites para la identificación de cabezas de ganado vacuno, reconocidos por la Sociedad Internacional de Genética Animal<sup>123</sup>, y suficientes para conseguir una huella genética única para cada animal. Posteriormente, esta información es introducida en una base de datos de la empresa que compara la huella genética con la de otros individuos, y confirma la identidad del animal.

El protocolo de actuación de este tipo de sistemas es casi siempre el mismo, y se puede resumir en el siguiente gráfico:

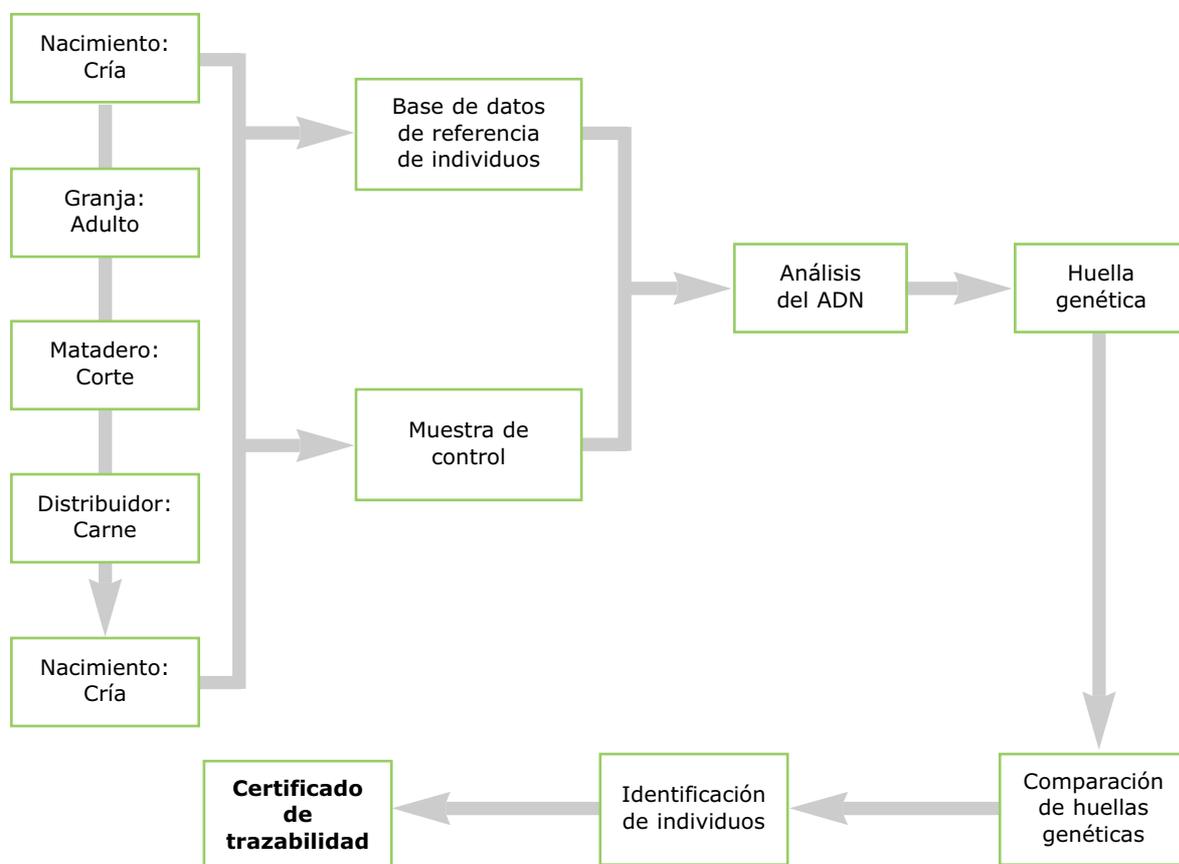


Fig. 9. Protocolo de análisis de alimentos por medio de Eurofins Tag®.  
 Fuente: elaboración propia, adaptado de Eurofins Corporate  
<http://www.eurofins.com/services/food/molecular%20biology/genotype/logistics.asp>

<sup>123</sup> International Society for Animal Genetics, <http://www.isag.org.uk>.

La obtención de muestras en la industria cárnica, para la trazabilidad del ganado y productos derivados, viene determinada por los clientes, y generalmente se realiza en el matadero. Así por ejemplo, la Universidad de Oviedo<sup>124</sup>, ha patentado recientemente un dispositivo de toma de muestras para la identificación de ganado mediante ADN adaptable al crotal, que podría representar un importante avance para ayudar al establecimiento de sistemas de trazabilidad en el sector cárnico.

Otra alternativa es la toma de muestras tras el nacimiento del animal, hecho frecuente en animales utilizados para reproducción. Así mismo, se pueden realizar muestreos de control a lo largo de toda la cadena de producción.

### 7.3. IdentiGEN

IdentiGEN<sup>125</sup> se creó a raíz de los problemas de higiene alimentaria derivados de la crisis de las vacas locas del año 1996. Está ubicada en el Instituto de Genética del Trinity College de Dublín, que ha desarrollado un sistema de muestreo y análisis molecular de carne vacuna para su identificación desde el origen hasta el consumidor. La tecnología TraceBack™ está patentada como herramienta de identificación y seguimiento de carne vacuna, permitiendo la rastreabilidad del alimento durante la cadena alimentaria.

El sistema **TraceBack™** tiene como objetivo conseguir la trazabilidad de la carne de ganado vacuno durante toda la cadena de producción. IdentiGen ha desarrollado un dispositivo de recogida de muestras que permite recoger muestras de menos de 1 gramo para su análisis. Aunque en principio el tipo de muestras que es capaz de analizar es muy variado, las muestras que se suelen recoger son sangre o carne. Una vez que se dispone de la muestra, se realiza su perfil genético mediante técnicas de análisis por secuenciación FINS<sup>126</sup>, mencionadas anteriormente en el presente informe, y las muestras se almacenan en una base de datos propia de la compañía. Esta técnica no es

equivalente a los análisis de la huella genética, los cuales identifican individuos, sino que se trata de estudios de población que identifiquen marcadores de variaciones genéticas específicas de especie.

Cuando el animal es despiezado y llega a su punto de venta, se recoge una segunda "muestra de verificación" y se compara su perfil genético con el de la "muestra de referencia" mediante técnicas de PCR cualitativas (RFLP, SSCP). La coincidencia de resultados indica que la muestra procede del corte del animal inicial, estando este identificado correctamente.

Aunque esta empresa no se dedica a comercializar kits de detección de especies de ganado, si ha realizado este servicio en ocasiones puntuales, como por ejemplo en un estudio que realizó a petición de las autoridades irlandesas en higiene alimentaria, en el cual se encontraron grandes contaminaciones de ADN vacuno en carne de pollo.

### 7.4. Biotoools

Biotoools, B & M Labs, S.A.<sup>127</sup> es una empresa española fundada en 1996, cuyas principales actividades se centran en la aplicación de técnicas de Biología Molecular en la resolución de problemas dentro de las áreas Agroalimentación, Biomedicina, Veterinaria.

El área de Agroalimentación de esta empresa se dedica al desarrollo, fabricación y comercialización de kits para el análisis de alimentos y enfermedades veterinarias. Los kits que Biotoools comercializa se dividen en tres tipos, **Kits Biofood**, o kits de detección de composición cárnica en alimentos frescos y procesados, **Kits Biogenic**, diseñados para la detección de OMGs en muestras frescas y procesadas, y **Kits Biofish**, desarrollados para la identificación de especies de pescados de interés comercial. Estos sistemas de análisis son sistemas cerrados, ya que todos los reactivos necesarios para cada paso de los diferentes análisis están incluidos en el kit (purificación, amplificación y control del ADN).

<sup>124</sup> WO 01/87054 A1 (Dra. Ana Domínguez Sanjurjo).

<sup>125</sup> IdentiGEN, <http://www.identigen.com>

<sup>126</sup> FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing).

<sup>127</sup> Biotoools, <http://www.biotoools.net>

## KITS DE AGROALIMENTACIÓN COMERCIALIZADOS POR BIOTOOLS

Nombre producto	Descripción
<b>Kits Biofood</b> <i>Detección de composición de carnes en productos frescos y procesados</i>	
Biofood Standard.	Co-detección de material vertebrado y vegetal.
Biofood Identification Kit.	Detección e identificación de especies de vertebrados en muestras heterogéneas.
Biofood Mixed Kit.	Detección e identificación de especies animales en muestras homogéneas.
<b>Kits Biogenic</b> <i>Detección de GMOs en muestras frescas y procesadas</i>	
Biogenics Standard.	Detección genérica de OGMs.
Biogenics Soya.	Identificación de soja RoundUp-Ready(TM) (Monsanto).
Biogenics Maize BT-176.	Identificación de maíz Event-176 Maximizer(TM) (Novartis).
Biogenics Maize Bt-11.	Identificación de maíz Bt-11 (TM) (Syngenta).
Biogenics Maize Mon810.	Identificación de maíz MON810(TM) (Monsanto).
<b>Kits Biofish</b> <i>Identificación de especies de peces en muestras frescas y procesadas</i>	
Biofish Cod Kit.	Detección e identificación de bacalao y gadiformes en muestras frescas y procesadas.
Biofish Salmon Kit.	Detección e identificación de especies de salmón y trucha, tanto para muestras frescas como procesadas (en un futuro).
Biofish Tuna ID Kit. Biofish Hake ID Kit. (ambos en desarrollo)	Detección e identificación de atún y merluza.

Tabla 14. Productos comercializados por Biotools, B & M Labs, S.A.  
Fuente: Adaptado de Biotools <http://www.biotools.net>

Así mismo, Biotools posee un Servicio de Análisis Agroalimentario relacionado con la identificación de especies animales, la detección de marcadores moleculares para mejora genética, y la detección y cuantificación de transgénicos. Esta empresa cuenta con certificación ISO 9001:2000 para los

reactivos y productos, y están acreditándose ante la SIO 17025 para ensayos agroalimentarios. También forman parte de un programa de acreditación de laboratorios a escala mundial organizado por el Departamento de Agricultura de los EE.UU. (USDA).

**SERVICIOS DE TRAZABILIDAD OFERTADOS POR BIOTOOLS:  
IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES**

		Características	Tipos de muestras	Técnica utilizada	Sensibilidad del análisis	Coste del servicio
Especies animales	Material animal	Detección de material animal y vegetal en muestras frescas y procesadas, incluyendo piensos.	Alimentos de uso humano o animal, frescos o procesados, homogéneos o heterogéneos (piensos, liofilizados, cereales, alimentación vegetariana, etc.	PCR	0,5%	50-60 €
		Detección e identificación de especies animales (vaca, cerdo, cabra, oveja, pollo y pavo) en muestras homogéneas frescas y procesadas.	Muestras frescas y procesadas, siempre que tengan uno o dos componentes mayoritarios en proporciones similares.	PCR múltiple RFLP-PCR	0,5%	75-90 €
		Detección e identificación de especies animales (hasta 30 especies diferentes) en muestras heterogéneas frescas y procesadas, incluyendo piensos.	Muestras frescas y procesadas, homogéneas o heterogéneas. Recomendado para detectar trazas de especies animales en alimentos. (carnes, huesos, piensos, embutidos, etc.).	RFLP-PCR	0,5-5%	125-150 €
	Mejora genética	Detección e identificación del gen de la hipertrofia muscular bovina (gen culón) para mejora genética.	Todo tipo de muestras biológicas (tejidos, sangre, semen, etc.).	PCR		50-60 €
		Detección del gel del síndrome del stress porcino en cerdo y alimentos.	Todo tipo de muestras biológicas (tejidos, sangre, semen, etc.), así como a productos derivados del cerdo.	PCR		60-75 €
	Peces	Detección e identificación de especies de bacalao y gadiformes en alimentos.	Muestras frescas y procesadas, homogéneas o heterogéneas.	RFLP-PCR	1%	125-150 €
		Detección e identificación de especies de salmónidos en alimentos.	Muestras frescas y procesadas, homogéneas o heterogéneas, así como en huevos y alevines.	RFLP-PCR	1%	125-150 €
		Identificación de especies de peces mediante secuenciación.	Muestras frescas y procesadas, homogéneas o heterogéneas, así como en huevos y alevines.	PCR y secuenciación		125 €

### SERVICIOS DE TRAZABILIDAD OFERTADOS POR BIOTOOLS: DETECCIÓN DE OMGs

	Características	Tipos de muestras	Técnica utilizada	Sensibilidad del análisis	Coste del servicio
<b>Transgénicos</b>	Detección de material transgénico en muestras frescas y procesadas.	Alimentos de uso humano o animal, frescos o procesados, homogéneos o heterogéneos.	PCR	0,01 - 0,1%, dependiendo de las muestras, según su naturaleza y grado de procesamiento.	75-90 €
	Detección e identificación de Soja RoundUp Ready™ de Monsanto.				90-110 €
	Detección e identificación de Maíz Bt-176 Maximizer™ de Syngenta y/o Maíz Bt-11 Yield Gard™ de Syngenta y/o Maíz MON810™ de Monsanto.				90-110 €
	Detección e identificación de Soja RoundUp Ready™ de Monsanto, Maíz Bt-176 Maximizer™ de Syngenta y/o Maíz Bt-11 Yield Gard™ de Syngenta y/o Maíz MON810™ de Monsanto.				135-165 €
	Cuantificación.	Maíz y soja transgénico.	RT-PCR		200-250 €

Tabla 15. Servicios de trazabilidad ofertados por Biotools, B & M Labs, S.A.  
Fuente: elaboración propia, tomado de Biotools (<http://www.biotools.net>).

## 7.5. Bionostra

Bionostra<sup>128</sup> es una empresa madrileña dedicada al desarrollo y comercialización de productos y servicios derivados de la investigación en biotecnología. Aunque dicha empresa comercializa kits de detección y cuantificación de OMGs en alimentos, tanto específicos para determinados eventos transgénicos como en un screening general, también ofrece la posibilidad de tener acceso a estos análisis mediante un servicio externo.

Así mismo, entre sus servicios de análisis de alimentos se recoge además la autenticación de alimentos y determinación de la pureza varietal de algunas especies en alimentos para consumo humano tanto frescos, como congelados o procesados (patés, salchichas, embutidos, conservas, etc.), y en alimentos de consumo animal. Las especies animales que identifican son el pollo, pavo, pato, ganso, avestruz, vaca, cerdo, conejo, oveja, jabalí, cabra, caballo, entre otras. En cuanto a los productos de la pesca, detectan la presencia de salmónidos, merluzas, atunes y

<sup>128</sup> Bionostra; <http://www.bionostra.net>

bonitos, bacalao y otros gadiformes, peces planos y otros (sardina, boquerón, arenque, palometa negra....). Recientemente, Bionostra ha lanzado al mercado un nuevo kit para la identificación específica de peces comerciales basado en el análisis del ADN, llamado **FishID Kit™**. Este kit se basa en la amplificación de secuencias específicas del ADN mitocondrial mediante el uso de la PCR, y contiene únicamente los reactivos para la extracción y amplificación. El usuario debe realizar la secuenciación del fragmento amplificado, y podrá entonces conectarse a una aplicación informática, la cual proporciona los resultados finales por medio de la comparación de la secuencia del fragmento con bases de datos propias de la empresa. Esta herramienta ha sido desarrollada por Alma Bioinformática<sup>129</sup>, empresa filial de Bionostra. Además de la identificación, esta empresa ofrece al usuario la certificación de identidad de todas aquellas especies de pescados incluidas en su base de datos.

Cabe mencionar la participación de Bionostra en rondas europeas de análisis (FSA, Food Standards Agency; FAPAS, Food Analysis Performance Assessment Scheme) con el objeto de certificar los métodos de análisis.

**PRODUCTOS COMERCIALIZADOS POR BIONOSTRA**

Motivo del análisis	Nombre del producto	Técnica utilizada	Sensibilidad del análisis	Muestra analizada	Coste del kit
Cuantificación de OMGs en alimentos.	HIFI GMO quantification Kit™	PCR en tiempo real y tecnología Taq-man/SYBR Green.	0,01%	Maíz Bt11 Maíz Mon 810 Maíz Bt 176 RR-Soja	500 € (88 reacciones)
Identificación específica de OMGs en alimentos.	HIFI GMO detection Kit™	PCR	0,01%	RR-soja Maíz Bt176 Maíz Bt11 T 25 maíz	275 € (96 reacciones)
	Multi HIFI GMO detection Kit™				400 € (144 reacciones)
Presencia o ausencia de OMGs en alimentos.	HIFI GMO screening Kit™	PCR	0,1%	Screening general de la presencia de OMGs en alimentos y piensos mediante la detección del promotor 35S CaMV.	Métodos Cualitativos: 225 € (76 reacciones)  Métodos Cuantitativos: 1.025 € (142 reacciones)
Identificación de especies de pescados.	FishID KIT™	PCR secuenciación		Variedad de especies de pescados de interés comercial <sup>130</sup> .	250 € (20 reacciones)

Tabla 16. Productos comercializados por Bionostra.

Fuente: Adaptado de Bionostra; <http://www.bionostra.net>

Bionostra también ofrece servicios de análisis cualitativo y cuantitativo de OMGs con un coste de entre 150-210 €, y un servicio de identificación genética, con un precio estimado de 150 €.

<sup>129</sup> ALMA Bioinformática; <http://www.almabioinfo.com>

<sup>130</sup> Listado de especies de pescados identificados por Bionostra; [http://www.almabioinfo.com/docs/en\\_list.html](http://www.almabioinfo.com/docs/en_list.html)

## 7.6. Z.E.U.-Inmunotec

Z.E.U.-Inmunotec<sup>131</sup> es una empresa ubicada en el Centro Europeo de Empresas e Innovación de Aragón (CEEI) situado en Zaragoza. Su principal actividad se centra en la investigación y desarrollo de nuevos productos de diagnóstico. Colaboran estrechamente con varios grupos de investigación de la Universidad de Zaragoza y Valencia en el desarrollo de nuevos tests.

Entre las actividades de esta empresa cabe destacar la comercialización de kits de detección de fraudes por mezclas de leche, basados en técnicas de identificación de proteínas. El **Test RC** utiliza la técnica de ELISA para detectar la presencia en leche de oveja o vaca de proteínas de oveja, vaca, o cabra, dando resultados en 1 hora 30 minutos para análisis cuantitativos y 30 minutos para análisis cualitativos. Otro tipo de kit que realiza

el mismo tipo de análisis es el **Test IC**, basado en la utilización de técnicas inmunocromatográficas, que proporciona resultados en tan solo 5 minutos.

Entre los productos de agroalimentación que comercializa Z.E.U.-Inmunotec es interesante señalar los **kits Proteon** que permiten la detección de proteínas vegetales (guisante, soja, trigo) en leche y productos lácteos a diferentes límites de detección.

Como la mayoría de los laboratorios privados dedicados al análisis de alimentos, esta empresa también comercializa una serie de kits de PCR para la detección de eventos transgénicos utilizando los promotores 35S y NOS-T como primers. Adicionalmente, pone a la venta material necesario para la realización de estos ensayos, como marcadores o primers para la detección de maíz genéticamente modificado Bt11, Bt176, T25 y MON810.

### PRODUCTOS COMERCIALIZADOS POR Z.E.U.-INMUNOTEC

Motivo del análisis	Nombre del kit
Detección de fraudes por mezclas de leche.	<b>TEST RC:</b> técnica de ELISA. <ul style="list-style-type: none"> <li>RC-Bovino: detección de presencia de leche de vaca en leche o queso de otras especies (oveja, cabra).</li> <li>RC-Caprino: detección de presencia de leche de cabra en leche o queso de otras especies (oveja, vaca).</li> </ul>
	<b>TEST IC:</b> técnica de inmunocromatografía. <ul style="list-style-type: none"> <li>IC-Bovino: detección de presencia de leche de vaca en leche o queso de oveja o de cabra.</li> <li>IC-Caprino: detección de presencia de leche de cabra en leche o queso de oveja.</li> </ul>
Detección de proteínas vegetales en leche y productos lácteos.	<b>PROTEON:</b> técnica de ELISA Límites de cuantificación: <ul style="list-style-type: none"> <li>0,69% de proteína de guisante en leche.</li> <li>0,08% de proteína de soja en leche.</li> <li>0,26% de proteína de trigo en leche.</li> </ul>
Detección de cereales genéticamente modificados.	Kits de PCR para el screening y confirmación de vegetales genéticamente modificados (secuencias 35S, NOS-T).
	Primers para la identificación del maíz (maíz genéticamente modificado Bt11, Bt176, T25 y MON810).
	Kit para la extracción de DNA (sistema de extracción con partículas de sílice magnetizadas, "Mag Easy").
	Material de PCR (Marcadores de peso molecular).

Tabla 17. Productos comercializados por Z.E.U.-Inmunotec, S.L.

Fuente: Adaptado de Z.E.U.-Inmunotec, S.L. <http://www.zeu-inmunotec.com>

<sup>131</sup> Z.E.U.-Inmunotec, S.L., <http://www.zeu-inmunotec.com>

## 8. Tendencias de consumo relacionadas con la trazabilidad alimentaria

Algunos Estados Miembros de la UE, como Francia, han elaborado encuestas<sup>132</sup> en las cuales queda patente la importancia que los consumidores otorgan a los atributos de calidad de los productos, lo que colocan en primer lugar por encima del precio. Como segunda preocupación a la hora de elegir entre varios productos, señalan el origen y los ingredientes de los alimentos, lo que implica la trazabilidad de los mismos, que vendría determinada por medio de etiquetados y certificados de calidad. Recientemente la Presidenta de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, anunció la creación de un Barómetro de la Seguridad Alimentaria.

Aunque el consumidor final tiene una tendencia cada vez mayor a exigir la presencia de alimentos que hayan sido sometidos a trazabilidad, las empresas pertenecientes al sector de la agroalimentación todavía no han reconocido esta necesidad en sus propios negocios, que incluye una importante inversión en sistemas de información. Según un estudio realizado en colaboración con las empresas AgInfoLink Global, Inc., John Deere, y eFarm, es posible hacer un cálculo aproximado del beneficio que supone para una empresa del sector agroalimentario la implantación de los procesos de trazabilidad en

sus actividades<sup>133</sup>. Conforme a este estudio, para un agricultor la inversión en un sistema de trazabilidad alimentaria con un coste del 0,5% de la materia prima, puede suponer un aumento de los beneficios finales entre un 2 y un 5%. En el sector ganadero los beneficios obtenidos serían mucho mayores, multiplicando por un factor de 5 a 15 la inversión realizada en sistemas de trazabilidad por cada cabeza de ganado.

Sin embargo, otros estudios<sup>134</sup> señalan que la implementación de la trazabilidad alimentaria por parte de la Unión Europea, se ha realizado sin llevar a cabo un análisis exhaustivo del coste y los beneficios asociados. Estas afirmaciones se basan en los resultados obtenidos tras la realización de una investigación con un grupo de consumidores, quienes colocaban en último lugar de importancia al etiquetado de ingredientes de los productos, frente a aquel relativo con la higiene alimentaria, o incluso el trato a los animales. Este estudio indica además la importancia que representa para el consumidor las fuentes de información en trazabilidad, señalando que el 50% de los consumidores encuestados prefiere a un organismo estatal como certificador oficial, mientras que casi un tercio de ellos se decanta por un sistema de etiquetado de calidad independiente.

<sup>132</sup> Barometer ConsoFrance, LSA N°1710 - 15/02/01.

<sup>133</sup> Jorgenson, B.; Larson, D.; Pape, W.R. (2002). Traceability – Cost Burden or Profit Opportunity. Food Traceability Report. May 2002, 24.

<sup>134</sup> Hobbs, J. (2002). Study finds traceability has limited appeal for consumers. Food Traceability Report. Oct. 2002, 6-7.

## 9. Casos prácticos

A continuación se presentan cuatro casos prácticos de empresas y centros de investigación españoles que desarrollan herramientas moleculares de trazabilidad alimentaria. Estos casos prácticos representan las contestaciones a un cuestionario sobre las tecnologías que desarrollan, las aplicaciones a que van dirigidas y la valoración objetiva de los resultados obtenidos. Esto casos permiten a la vez identificar barreras y oportunidades a la hora de implantar sistemas de trazabilidad alimentaria.

### CASO PRÁCTICO 1

**Nombre de la institución o empresa:** Dpto. de Nutrición y Bromatología III.  
Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

**Actividad principal:** Investigación en identificación de especies animales.

**Dirección web:** <http://www.vet.ucm.es>

### Tecnología e implantación

Proyectos en curso relacionados con trazabilidad alimentaria:

1. Utilización de técnicas inmunológicas y genéticas en la diferenciación de especies de pescado ahumado.
2. Identificación de pescados planos fileteados mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
3. Identificación de mero, cherna y perca mediante técnicas genéticas.
4. Utilización de técnicas de PCR, PCR-ELISA y PCR-cuantitativo en tiempo real para la identificación y cuantificación de diferentes especies animales en productos cárnicos.
5. Identificación y cuantificación de la leche de vaca, oveja, cabra y búfala en mezclas de leche y queso mediante la de técnicas de PCR y de PCR cuantitativo en tiempo real.

Tipo de expertos pertenecientes a proyectos de trazabilidad: 3 becarios, 3 doctores.

Tipo de experiencia de los expertos: PCR, PCR cuantitativo, ELISA, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales.

Tipo de formación de los expertos: Veterinaria, Ciencia y Tecnología de los alimentos.

### Aplicaciones

Sectores de aplicación de la trazabilidad:  
Identificación de especies (autenticación): Bovino, Ovino, Caprino, Porcino, Salmónidos,  
Tipo de material analizado: Congelados, Precocinados.  
Otros alimentos analizados: Leche, Carnes, Foie.

Tipo de Tecnología de trazabilidad utilizada

- Análisis de ADN: PCR-SSCP, PCR-RAPD, PCR-RFLP, PCR en tiempo real, PCR múltiple.
- Análisis de proteínas: Western Blot, ELISA.

Actividades realizadas por su grupo de trabajo:

- Operaciones internas: Recogida de la muestra, Extracción de ADN, Amplificación mediante PCR, Extracción de proteínas, Inmunoensayo.
- Dificultades encontradas: Dificultad para disponer de número suficiente de muestras de algunas especies en determinados casos.
- Servicios externos: Secuenciación.

### Resultados y valoración

Factores responsables del reciente interés por la trazabilidad:

- Relevancia muy alta: Cumplimiento de la legislación.
- Relevancia alta: Certificación de estándares, Mejora de la calidad de productos propios.
- Relevancia media: Control de seguridad alimentaria, Requerimiento del consumidor, Interés por entrar en el sector de la trazabilidad, Nuevas aplicaciones para tecnologías existentes.

Grado de satisfacción de las tecnologías de trazabilidad:

- Muy satisfecho: ELISA.
- Satisfecho: PCR-RFLP, PCR múltiple, PCR-SSCP, PCR en tiempo real, Western Blot.

Aspectos susceptibles de mejora de las tecnologías:

- Relevancia muy alta: Coste.
- Relevancia alta: Fiabilidad de resultados por PCR, Legislación.
- Relevancia media: Umbrales de detección, Robustez, Implementación.
- Relevancia baja: Portabilidad.

Perspectivas futuras de las tecnologías de trazabilidad:

- Relevancia alta: PCR en tiempo real, PCR múltiple, ELISA.
- Relevancia media: PCR-SSCP, PCR-RAPD, PCR-SFLP, PCR-RFLP, PCR competitiva, PCR anidada, PCR dilución límite, Western Blot, Isoelectroenfoque.

**CASO PRÁCTICO 2**

**Nombre de la institución o empresa:** Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC).  
Química y Tecnología de Productos Marinos.

**Actividad principal:** Identificación de especies en productos marinos.

**Dirección web:** <http://www.iim.csic.es>

**Tecnología e implantación**

Proyectos en curso relacionados con trazabilidad alimentaria:

1. Desarrollo de métodos de identificación y cuantificación de especies de pescado mediante el empleo de técnicas de genética molecular.
2. Desarrollo de un kit de diagnóstico rápido para la identificación de especies de tónidos y gádidos en productos pesqueros frescos y procesados mediante técnicas de análisis de ADN (KITCOL).
3. Estudio integral de la evolución de la calidad microbiológica, sensorial y nutricional durante la fabricación de conservas de tónidos y mejillón: optimización de las líneas de producción y de los sistemas de trazabilidad.

Tipo de expertos pertenecientes a proyectos de trazabilidad: 2 Becarios, 3 Doctores, 1 Técnico, 2 FP II, 1 Otros.

Tipo de experiencia de los expertos: Secuenciación, PCR, Agroalimentación.

Tipo de formación de los expertos: Biología, Química.

**Aplicaciones**

Sectores de aplicación de la trazabilidad:

Identificación de especies (autenticación): Bovino, Ovino, Caprino, Porcino, Equino, Tónidos, Salmónidos, Otros (organismos marinos en general).

Tipo de material analizado: Enlatados, Congelados, Precocinados, Desmigados, Elaborados.

Tipo de Tecnología de trazabilidad utilizada

- Análisis de ADN: PCR-SSCP, PCR-RFLP, PCR en tiempo real, FINS (secuenciación).
- Análisis de proteínas: Isoelectroenfoque.

Actividades realizadas por su grupo de trabajo:

- Operaciones internas: Recogida de la muestra, Extracción de ADN, Amplificación mediante PCR, Secuenciación
- Factores determinantes en la realización de operaciones internas: Personal propio, equipamiento y conocimientos
- Dificultades encontradas: Disponibilidad de personal propio en plantilla.
- Ventajas encontradas: Se controlan todos los pasos del análisis.
- Servicios externos: ninguno.

**Resultados y valoración**

Factores responsables del reciente interés por la trazabilidad:

- Relevancia muy alta: Control de seguridad alimentaria, Requerimiento del consumidor, Nuevas aplicaciones para tecnologías existentes.
- Relevancia escasa: Interés por entrar en el sector de la trazabilidad, Cumplimiento de la legislación, Certificación de estándares, Mejora de la calidad de productos propios.

Grado de satisfacción de las tecnologías de trazabilidad:

- Muy satisfecho: FINS (secuenciación).
- Satisfecho: PCR-RFLP, PCR en tiempo real, Isoelectroenfoque.
- Poco Satisfecho: PCR-SSCP.
- Nada Satisfecho: PCR-RAPD.

Aspectos susceptibles de mejora de las tecnologías:

- Relevancia alta: Legislación, Portabilidad.
- Relevancia media: Implementación, Coste.
- Relevancia baja: Fiabilidad de resultados por PCR, Umbrales de detección, Robustez.

Perspectivas futuras de las tecnologías de trazabilidad:

- Relevancia alta: PCR en tiempo real.
- Relevancia media: PCR-RFLP.
- Relevancia baja: Isoelectroenfoque.
- Relevancia escasa: Western Blot, ELISA, PCR-SSCP, PCR-RAPD, PCR-SFLP, PCR competitiva, PCR anidada, PCR multiplexada, PCR dilución límite.

### CASO PRÁCTICO 3

**Nombre de la institución o empresa:** BIONOSTRA S.L.

**Actividad principal:** Desarrollo y aplicación de herramientas de biotecnología para el análisis funcional de genomas.

**Dirección web:** <http://www.bionostra.net>

#### Tecnología e implantación

Proyectos en curso relacionados con trazabilidad alimentaria:

1. Biosensores de ADN para aplicaciones analíticas y etiquetado de alimentos.
2. Obtención de marcadores genéticos (microsatélites) de lubina (*Dicentrarchus labrax*).
3. Desarrollo de métodos de alta sensibilidad para detección, identificación y cuantificación de OGM en alimentos.
4. Optimización de herramientas biotecnológicas para su aplicación en el control de la calidad y la seguridad alimentaria.
5. Desarrollo de nuevas tecnologías de detección de compuestos de interés agroalimentario.

Tipo de expertos pertenecientes a proyectos de trazabilidad: 1 Becario, 2 Doctores, 4 Técnicos, 1 FP II.

Tipo de experiencia de los expertos: PCR, Agroalimentación, OMGs.

Tipo de formación de los expertos: Ingeniería, Biología, Química.

#### Aplicaciones

Sectores de aplicación de la trazabilidad:

Identificación de especies (autenticación): Bovino, Ovino, Caprino, Porcino, Equino, Túnidos, Salmónidos, Otros (merlúcidos, gádidos, cefalópodos, langostinos, etc.).

Detección de Organismos Modificados Genéticamente: Colza, Soja, Maíz.

Tipo de material analizado: Enlatados, Congelados, Precocinados, Desmigados, Elaborados, Embutidos, Quesos, Patés, Otros (piensos).

Tipo de Tecnología de trazabilidad utilizada

- Análisis de ADN: PCR-RAPD, PCR-RFLP, PCR en tiempo real.

Actividades realizadas por su grupo de trabajo:

- Operaciones internas: Recogida de la muestra, Extracción de ADN, Amplificación mediante PCR.  
Factores determinantes en la realización de operaciones internas: disponibilidad de equipos y personal.
- Servicios externos: Secuenciación  
Factores determinantes en la subcontratación de servicios externos: falta de equipos.

#### Resultados y valoración

Factores responsables del reciente interés por la trazabilidad:

- Relevancia muy alta: Interés por entrar en el sector de la trazabilidad, Cumplimiento de la legislación.
- Relevancia alta: Mejora de la calidad de productos propios, Control de seguridad alimentaria.
- Relevancia media: Requerimiento del consumidor.
- Relevancia escasa: Certificación de estándares, Nuevas aplicaciones para tecnologías existentes.

Grado de satisfacción de las tecnologías de trazabilidad:

- Muy satisfecho: PCR-RFLP, PCR en tiempo real.
- Satisfecho: PCR-RAPD.
- Poco Satisfecho: PCR multiplexada.

Aspectos susceptibles de mejora de las tecnologías:

- Relevancia muy alta: Coste, Legislación.
- Relevancia alta: Umbrales de detección.
- Relevancia media: Implementación.
- Relevancia baja: Robustez, Portabilidad.
- Relevancia escasa: Fiabilidad de resultados por PCR.

Perspectivas futuras de las tecnologías de trazabilidad:

- Relevancia muy alta: Microarrays de ADN y proteínas, PCR en tiempo real.
- Relevancia alta: PCR-RAPD, ELISA.
- Relevancia baja: PCR-RFLP.
- Relevancia escasa: PCR-SSCP, PCR-SFLP, PCR competitiva, PCR anidada, PCR multiplexada, PCR dilución límite, Western Blot, Isoelectroenfoque.

**CASO PRÁCTICO 4**

**Nombre de la institución o empresa:** BIOTOOLS B&M Labs.

**Actividad principal:** Comercialización de productos de biología molecular y kits de diagnóstico. Laboratorio de análisis y control de calidad.

**Dirección web:** <http://www.biotoools.net>

**Tecnología e implantación**

Proyectos en curso relacionados con trazabilidad alimentaria:

1. Identificación de especies vegetales por PCR.
2. Identificación de especies pesqueras por PCR.
3. Cuantificación de especies animales por PCR en tiempo real.

Tipo de expertos pertenecientes a proyectos de trazabilidad: 2 Doctores, 2 FP II, 2 Licenciados.

Tipo de experiencia de los expertos: Secuenciación, PCR, Agroalimentación, OMGs.

Tipo de formación de los expertos: Biología y Farmacia.

**Aplicaciones**

Sectores de aplicación de la trazabilidad:

Identificación de especies (autenticación): Bovino, Ovino, Caprino, Porcino, Equino, origen Aviar (pato, oca, pollo, pavo), Túnidos, Salmónidos, Merluzas, Bacalaos y Peces planos.

Detección de Organismos Modificados Genéticamente: Soja, Maíz (detección del promotor 35S y terminador NOS del 90% de los GMOs, e identificación de soja y maíces transgénicos aprobados por la UE). Cuantificación.

Tipo de material analizado: Piensos, Enlatados, Congelados, Precocinados, Desmigados, Elaborados, Embutidos, Quesos, Patés, Otros (fragmentos de huesos, pelos, sangre, etc.).

Tipo de Tecnología de trazabilidad utilizada:

- Análisis de ADN: PCR-RFLP, PCR competitiva, PCR en tiempo real, PCR multiplexada, secuenciación.
- Análisis de proteínas: ELISA.

Actividades realizadas por su grupo de trabajo:

- Operaciones internas: Recogida de la muestra, Extracción de ADN, Amplificación mediante PCR, Secuenciación
- Factores determinantes en la realización de operaciones internas: controles positivos y negativos tanto en la extracción de ADN como en la PCR, duplicados de las muestras, evitar contaminaciones (uso de puntas con filtro, soluciones DNAsidas, zonas de extracción de ADN, PCR y electroforesis presurizados independientemente), personal cualificado.
- Dificultades encontradas: contaminaciones si el personal no está formado convenientemente
- Ventajas encontradas: técnicas rápidas, sensibles y específicas.
- Servicios externos: recogida de la muestra

**Resultados y valoración**

Factores responsables del reciente interés por la trazabilidad:

- Relevancia muy alta: Cumplimiento de la legislación, Mejora de la calidad de productos propios.
- Relevancia alta: Certificación de estándares, Control de seguridad alimentaria.
- Relevancia media: Interés por entrar en el sector de la trazabilidad, Requerimiento del consumidor, Nuevas aplicaciones para tecnologías existentes.

Grado de satisfacción de las tecnologías de trazabilidad:

- Muy satisfecho: PCR en tiempo real, PCR multiplexada.
- Satisfecho: ELISA, PCR-RFLP.
- Poco Satisfecho: PCR competitiva.

Aspectos susceptibles de mejora de las tecnologías:

- Relevancia muy alta: Portabilidad, Legislación, Implementación.
- Relevancia media: Coste.
- Relevancia escasa: Fiabilidad de resultados por PCR, Umbrales de detección, Robustez.

Perspectivas futuras de las tecnologías de trazabilidad:

- Relevancia muy alta: Microarrays de ADN y proteínas, PCR en tiempo real, PCR anidada, PCR multiplexada, Calidad de los resultados obtenidos (normas ISO), Documentación, Nuevos marcadores genéticos tipo microsatélites.
- Relevancia alta: PCR-RFLP, Espectrometría de masas MALDI-TOF, Cromatografía líquida, Cromatografía de gases
- Relevancia media: ELISA, Isoelectroenfoque.
- Relevancia baja: PCR-SSCP, PCR-RAPD, PCR-SFLP, Western Blot, SNIF-NMR (Site-Specific Natural Isotope Nuclear Magnetic Resonance), IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry), Espectroscopia infrarroja cercana.
- Relevancia escasa: PCR competitiva, PCR dilución límite.

## 10. Conclusiones

En la realización de este informe, se han consultado y analizado numerosas publicaciones científicas y patentes internacionales, además de realizar entrevistas a un nutrido grupo de investigadores de centros públicos y de expertos empresariales. La realización de este documento de trabajo nos ha permitido conocer la realidad tecnológica, e incluso económica y social, acerca de la trazabilidad alimentaria, llegando a la conclusión de que **la genómica y la proteómica serán las tecnologías clave para controlar y asegurar la calidad e higiene de los alimentos**. No debemos olvidar que la calidad e higiene alimentaria es una de las principales preocupaciones en los barómetros europeos de consumo, es decir, aquellos que miden la opinión de la sociedad de la Unión Europea.

La mayoría de los expertos consultados señalan la prevalencia de los ensayos de **análisis de ADN** como método de trazabilidad alimentaria, ya que proporcionan una alta sensibilidad, y grandes posibilidades en el desarrollo de productos o kits de **identificación de transgénicos y de especies** de interés comercial. Por otro lado, las empresas que ofrecen este tipo de servicios señalan su preferencia por las modalidades de PCR en tiempo real y multiplexada, como métodos cuantitativos en la detección de Organismos Modificados Genéticamente (OMGs), mientras que la PCR-RFLP suele ser la elegida para la identificación de especies animales o vegetales.

Por otro lado, es necesario señalar que aunque es posible conseguir una identificación muy precisa de numerosas especies, es frecuente recurrir a la secuenciación directa debido a la complejidad del genoma de determinadas especies, como ocurre en el caso de los peces. Los centros de investigación consultados emplean todo tipo de modalidades de PCR, y poseen bases de datos extensas pertenecientes a especies identificadas por diversos métodos. Sin embargo, estos centros no tienen por objetivo principal el ofrecer servicios de trazabilidad, y por lo general prefieren centrar sus actividades en el ámbito científico. Tanto empresas como investigadores señalan a la **PCR en tiempo real** como una de las más relevantes y con mayor perspectiva de futuro, junto con **microarrays de ADN y proteínas**.

Aunque las técnicas basadas en el análisis de ADN sean las predominantes, el **análisis de proteínas** mediante ELISA sigue siendo una de las técnicas mejor valoradas por los investigadores consultados. Los expertos que han formado parte en la elaboración de este informe muestran igualmente interés por métodos basados en el análisis de proteínas, en especial por inmunoensayos con anticuerpos dirigidos a la identificación de especies, y otras técnicas como el isoelectroenfoque (IEF).

Según los expertos consultados, el cumplimiento de la legislación en materia de etiquetado y trazabilidad es la principal motivación de la industria agroalimentaria para implantar este tipo de sistemas. No obstante, las empresas que están dispuestas a cumplir la normativa de etiquetado y trazabilidad se encuentran con un problema debido a la **falta de organismos certificadores** en este tipo de análisis. A su vez, las empresas que prestan servicios de análisis se encuentran con la **falta de materiales de referencia** con los que poder comparar las muestras analizadas. El hecho de que no existan actualmente materiales estándar, obliga a las empresas dedicadas a ofrecer servicios de trazabilidad a utilizar diversas fuentes para abastecerse de estos materiales.

El problema que genera la falta de materiales de referencia es uno de los responsables de que no exista un consenso que permita una certificación a nivel europeo, o incluso nacional.

En España, existen varias posibilidades donde encontrar algunos de estos materiales de referencia para la identificación de especies, entre las que cabe destacar centros de investigación, como aquellos centrados en la identificación de especies de peces marinos (IIM de Vigo, CSIC), o laboratorios de referencia pertenecientes al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Respecto a los alimentos transgénicos, los materiales de referencia de origen vegetal suelen provenir de centros u organismos internacionales como el IRMM (Institute for Reference Materials & Measurements) de la Comisión Europea, mientras que en el caso de muestras animales, es frecuente que los laboratorios de análisis posean clones de células animales transgénicas que puedan cultivar fácilmente.

No obstante, para el caso concreto de OGMs, el número de materiales de referencia y por lo tanto de ensayos homologados se limita a dos (soja y maíz genéticamente modificados). La **falta de disponibilidad de materiales de referencia** es, hoy en día, una **barrera clara a la implantación de sistemas fiables de trazabilidad** alimentaria, que se complicará en el futuro, con la llegada de la nueva generación de OGMs, los cuales contendrán más de una proteína transgénica introducida o alterada. La creación de una red de laboratorios de referencia sería el primer paso a realizar en la elaboración de protocolos comunes que permitan una certificación adecuada, lo que a su vez impulsará a la industria alimentaria a aplicar la normativa de etiquetado correctamente. Este tipo de red ya ha sido creada en Europa con el objetivo de crear un protocolo común de análisis de organismos transgénicos<sup>135</sup>.

Por otro lado, parece lógico que los materiales de referencia se establezcan independientemente del método analítico que se utilice, y deberían estar enfocados hacia los alimentos frescos o los ingredientes base, en vez de hacia los alimentos procesados.

Otro de los problemas que presenta la implantación de sistemas de trazabilidad que aseguren el cumplimiento del marco legal, es la necesidad de desarrollar los reactivos necesarios (Ej. cebadores<sup>136</sup>) para los ensayos analíticos que determinan la presencia de OGMs o la identificación de especies. Algunos de estos reactivos no están disponibles y hay que desarrollarlos, situación ésta que hoy en día no genera una gran problemática, pero que podría ser conflictiva en el futuro, con la incorporación de la nueva generación de OGMs. En este sentido ya se están desarrollando soluciones globales, como la propuesta por el NIAB<sup>137</sup> de Cambridge (UK) que implica la inserción obligatoria, a todos los productores de semillas transgénicas, de una secuencia de identificación universal (código de barras de ADN).

En resumen, podría asegurarse, no sin riesgo, que la situación actual en torno a la trazabilidad alimentaria, combina una serie de elementos que generan una situación, cuando menos de incertidumbre. Por un lado:

- La industria agroalimentaria estima que los costes de la trazabilidad alimentaria son excesivos, teniendo en cuenta el retorno que ofrece, y parece tan solo estar interesada en cumplir la legalidad vigente.
- La implantación de sistemas veraces de etiquetado y trazabilidad no generan valor añadido en la industria, puesto que no se pueden ejecutar controles adecuados que diferencien estos productos de aquellos que han sido fraudulentamente etiquetados y trazados.
- La industria alimentaria utiliza las técnicas de trazabilidad alimentaria como medio de control hacia sus proveedores.
- La mayoría de los operadores del sector agroalimentario no poseen sistemas de certificación por lotes, lo que supone el paso previo para realizar un etiquetado veraz.
- Las empresas de biotecnología dedicadas al aseguramiento de la trazabilidad, no encuentran respaldo para validar y homologar los servicios y productos que ofertan.

Por otro lado:

- Los legisladores europeos han respondido a las crisis alimentarias y de confianza de los consumidores, mediante el establecimiento de normas de certificación, etiquetado y trazabilidad.
- Tanto la legislación europea como la transpuesta a nivel nacional obliga y obligará en un futuro a desarrollar sistemas de etiquetado y trazabilidad, en especial de OGMs y de identificación de especies.
- El consumidor no demanda específicamente sistemas de etiquetado y trazabilidad, sino que exige calidad e higiene en los alimentos.
- El cumplimiento del marco legal vigente, y por ende de las declaraciones realizadas en las etiquetas de productos agroalimentarios, que pueden contener OGMs o distintas especies, es difícil de asegurar.

<sup>135</sup> ENGL, European Network of OMG Laboratories; <http://biotech.jrc.it/engl.htm>

<sup>136</sup> Los cebadores son pequeñas secuencias específicas de cada especie o de cada OMG que arrancan la reacción de análisis, para detectar o no presencia y cuantía del material buscado.

<sup>137</sup> National Institute of Agricultural Botany.

El resultado de la integración de todos estos factores, sin menoscabo de la calidad e higiene de los productos alimentarios, principal preocupación de la industria, los consumidores y las administraciones, es que **disponemos de una normativa de trazabilidad alimentaria de complicado cumplimiento y difícil control**, y que podría no responder adecuadamente a los fines que persigue. En este contexto, se hace necesario, una **mayor inversión en el desarrollo de tecnologías basadas en el análisis de ADN y/o de proteínas**, incluido el desarrollo de ensayos validados u homologados, que faciliten la puesta en marcha y control de sistemas veraces de trazabilidad alimentaria.

Por último, señalar que al cierre de edición de este informe el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación estaba estudiando la posibilidad de autorizar la comercialización de cinco nuevas variedades de plantas transgénicas, por lo que España podría convertirse en el primer país de la UE en autorizar este tipo de OMG, desde la implantación de la moratoria en el Consejo Europeo. Esta situación, que sin duda podría ser representativa del contexto futuro de la agricultura en España, refuerza aun más, si cabe, la importancia que tienen y tendrán las tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria.

# 11. ANEXOS

## ANEXO I:

### PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN ESPAÑOLES EN TRAZABILIDAD

Centro	Línea de trabajo
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).	Aplicación de nuevos marcadores moleculares a problemas genéticos del cerdo ibérico: base genética de caracteres de calidad, identificación y caracterización de poblaciones.
Universidad Complutense de Madrid.	Identificación genética de especies de pescado y marisco Identificación inmunológica de especies animales en alimentos.
AZTI	Desarrollo de un kit de diagnóstico rápido para identificación de especies de túnidos y gádidos en productos frescos y procesados mediante técnicas de análisis de ADN.  GENFISH: Aplicación de técnicas genéticas para la Identificación de especies pesqueras de interés comercial en la CAPV.
Centro de Enlace para la Innovación.	Kits de identificación de componentes cárnicos en alimentación humana y animal mediante técnicas de ADN.
Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC). Departamento de Química y Tecnología de Productos Marinos.	Caracterización de proteínas o péptidos específicos de especies de pescado que puedan actuar como biomarcadores.
Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (CSIC). Química y Tecnología de Productos Marinos.	Identificación de especies de gádidos en productos refrigerados y congelados por medio de técnicas inmunológicas.
Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC) Química y Tecnología de Productos Marinos.	Autenticación de especies de sardina y anchoa en conservas y semiconservas mediante técnicas de análisis de ADN. Desarrollo de técnicas moleculares genéticas para la identificación y cuantificación de pescado y marisco. Desarrollo de un kit de diagnóstico rápido para la identificación de especies de túnidos y gádidos en productos pesqueros frescos y procesados mediante técnicas de análisis de ADN (KITCOL).
Instituto del Frío. CSIC.	Ciencia y tecnología de carne y productos cárnicos y pescados y productos de pesca.
Universidad Complutense de Madrid. Facultad de veterinaria. Dpto. Nutrición y Bromatología III.	Utilización de técnicas inmunológicas y genéticas (PCR) en la diferenciación de especies de pescado, carne microorganismos alterantes y patógenos emergentes.
Universidad Complutense. Facultad Veterinaria. Departamento de Nutrición y Bromatología.	Utilización de técnicas inmunológicas y genéticas en la diferenciación de especies de pescado ahumado.
Dpto. de Biotecnología. AINIA.	Caracterización de alimentos.

Centro	Línea de trabajo
Dpto. Física-Química. Universidad de Cádiz.	Propiedades fisicoquímicas de alimentos. Autenticación y adulteración.
Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo CSIC.	Identification of species in processed seafood products using DNA-based diagnostic techniques.
Universidad de Oviedo. Fundación AZTI. Pescados Paco, S.A.	Genetic identification of fish eggs by species-specific DNA markers for use in stock biomass assessments and detection of commercial fraud.
Gumiel y Mendía, S.L	Trazabilidad en hortofruticultura ecológica. Proyecto CDTI aprobado (Junio - 2002).
Centro Tecnológico GAIKER (Parque Tecnológico de Zamudio).	Adaptación de la técnica PCR para su uso industrial en la identificación rápida y segura de patógenos en alimentos percederos. Diseño y desarrollo de técnicas de análisis genético para la autenticación de origen, y calidad de alimentos. Detección de la presencia de organismos transgénicos en productos alimentarios (GMO/OMG) para su etiquetado mediante técnicas de PCR.
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) Dpto. de Biotecnología de los Alimentos.	Detección e identificación de bacterias alterantes de alimentos por técnicas moleculares.
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (CIDA).	Prospección, identificación, caracterización y evaluación de variedades autóctonas de olivo en las comunidades de Valencia y Murcia.
Estación Experimental del Zaidín (CSIC). Departamento: Dpto. Ciencias de la Tierra y Química Ambiental (España).	Estudio isotópico de biomarcadores: ácidos grasos, n-alcanos, etc.
Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CSIC). Servei d'Anàlisis Biològiques Quantitatives.	Servicio de secuenciación de ADN. Servicio de detección de transgénicos.

Fuente: elaboración propia.

**PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EUROPEOS EN TRAZABILIDAD**

Centro	Línea de trabajo
Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo. CSIC.	Identification of species in processed seafood products using DNA-based diagnostic techniques.
Hanse Analytik GMBH Alemania Universidade de Santiago de Compostela. IIM de Vigo. CSIC.	Development of molecular genetic methods for the identification and quantification of fish and seafood products.
Laboratory of the Government Chemist (LGC), Reino Unido.	Identification of fraudulent replacements in meat.
Institute of Marine Biology of Crete. Grecia.	The use of molecular genetic markers for the study of stock structure of anchovy.
Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF) Reino Unido. IIM de Vigo. CSIC. Universidad de Santiago de Compostela.	The identification of canned tuna species by characterisation of the nucleic acids.
University of East Anglia Reino Unido.	A calibration of different molecular markers for use in discrimination and management of stocks of commercially important fish species.
Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reino Unido.	An investigation of the potencial of molecular biological methods for stock discrimination in commercially important marine species.
Rowett Research Institute. Escocia. Insituto de Investigaciones Marinas de Vigo. CSIC.	Identification and quantitation of species in marine products.
Universidad de Oviedo. Fundación AZTI. Pescados Paco, S.A.	Genetic identification of fish eggs by species-specific DNA markers for use in stock biomass assessments and detection of commercial fraud.
D.L.O. - Dienst Landbouwkundig Onderzoek Netherlands.	Advanced methods for identification and quality monitoring of (heat)processed fish.
CCFRA. Reino Unido.	Identification and quantification of DNA markers associated with food authenticity.
CCFRA. Reino Unido.	New DNA technologies for food authenticity quality and safety.

Fuente: elaboración propia.

## PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN NO EUROPEOS EN TRAZABILIDAD

Centro	Línea de trabajo
Dept. Of Nutrition And Food Science, Auburn University.	Detection of poultry in cooked meats using monoclonal antibody competitive ELISA.
Ministry of Food and Agriculture. Canadá.	Assessment of Protein Fingerprinting Method for Species Verification of Meats.
Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Ontario Canadá.	Detecting and quantitating meat species substitution.
Fisheries & Allied Aquaculture Auburn University.	Identification of DNA markers for genotyping sub-species populations of fish.
Food & Nutrition. Auburn University.	Thermal-stable species marker proteins for detection of meat species adulteration.
Food & Nutrition. Auburn University.	Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detection of meat species adulteration.
Fisheries & Wildlife. Virginia Polytechnic Institute.	Genetic maps of aquaculture species.
Botany & Microbiology. Auburn University.	DNA Analyses for rapid detection, strain differentiation, and vaccine development for the fish.
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD).	Capillary electrophoresis for meat species differentiation.

Fuente: elaboración propia.

**ANEXO II:**

**ALGUNAS COMPAÑÍAS QUE COMERCIALIZAN TESTS DE DETECCIÓN DE OMGs**

País	Nombre de la Compañía	Enlace
Francia	AGROGENE S.A.	<a href="http://www.agrogene.com">http://www.agrogene.com</a>
Suiza	Biosmart GmbH	<a href="http://www.biosmart.ch">http://www.biosmart.ch</a>
Alemania	GeneScan Europe AG <a href="http://www.genescan-europe.com">http://www.genescan-europe.com</a>	<a href="http://www.genescan.com">http://www.genescan.com</a>
	Hanse Analytik (part of GeneScan)	<a href="http://www.hanse-analytik.de">http://www.hanse-analytik.de</a>
	SCIL Diagnostics GmbH	<a href="http://www.scildiagnosics.com">http://www.scildiagnosics.com</a>
Irlanda	IdentiGEN Ltd.	<a href="http://www.identigen.com">http://www.identigen.com</a>
Inglaterra	RHM Technology Ltd.	<a href="http://www.rhmtech.demon.co.uk">http://www.rhmtech.demon.co.uk</a>
EEUU	Biodiagnostics Inc.	<a href="http://www.biodiagnostics.net">http://www.biodiagnostics.net</a>
	Biogenetic Services	<a href="http://www.biogeneticservices.com">http://www.biogeneticservices.com</a>
	DuPont Qualicon Inc.	<a href="http://www.qualicon.com">http://www.qualicon.com</a>
	EnviroLogix, Inc.	<a href="http://www.envirologix.com">http://www.envirologix.com</a>
	Eurofins Scientific, Inc.	<a href="http://www.eurofins.com">http://www.eurofins.com</a>
	GeneScan USA	<a href="http://www.gmotesting.com">http://www.gmotesting.com</a>
	Genetic ID	<a href="http://www.genetic-id.com">http://www.genetic-id.com</a>
	Ilcrop	<a href="http://www.ilcrop.com">http://www.ilcrop.com</a>
	MWseed Mid-West Seed Services, Inc.	<a href="http://www.mwseed.com">http://www.mwseed.com</a>
	Promega Corporation	<a href="http://www.promega.com">http://www.promega.com</a>
	STA Laboratories	<a href="http://www.stalabs.com">http://www.stalabs.com</a>
	Strategic Diagnostics, Inc.	<a href="http://www.sdix.com">http://www.sdix.com</a>
Xenogenix ApS	<a href="http://www.xenogenix.com">http://www.xenogenix.com</a>	
China	GMOcert	<a href="http://www.gmocert.com">http://www.gmocert.com</a> <a href="http://www.dnachip.com.hk">http://www.dnachip.com.hk</a>

Fuente: elaboración propia.

## ANEXO III:

### PATENTES EUROPEAS Y ESTADOUNIDENSES RELACIONADAS CON TRAZABILIDAD

Nº de patente	Título patente	Solicitante
US2002090663	Immunoassay for fish identification.	Univ florida atlantic (US)
EP0807690	Method and compositions for identification of species origin of caviar.	Karl schmitz scholl fonds fuer (DE)
WO9205277	Test to determine an organism's species and/or population identity by direct nucleotide sequence analysis of defined segments of its genome.	Davidson William Scott (CA); Bartlett Sylvia Ernestine (CA)
EP0120658	Method for identifying and characterizing organisms.	Webster John A Jr
WO9102250	Hybridomas and monoclonal antibodies therefrom having specific reactivity toward heavy chain immunoglobulin from catfish.	Us Agriculture (US)
WO02077278	Universal primers for wildlife identification.	Verma Sunil Kumar (IN); Singh Lalji (IN); Council Scient Ind Res (IN)
EP1182265	Method for determining genetic traits of improved breed animal embryos prior to implantation.	EIDGENOESS TECH HOCHSCHULE (CH)
WO9213102	Polymorphic dna markers in bovidae.	Genmark (US)
EP0382261, A3	DNA probes to VNTR loci.	Virginia Mason Res Center (US); Genelex Corp (US)
WO8907658	Genetic identification employing dna probes of variable number tandem repeat loci.	Univ Utah (US)
FR2648151	Bovine mini-satellite probe specific to the bovine y chromosome.	Georges Michel (BE); Christophe Daniel (BE); Dumont Jacques (BE); Peret Jason (BE); Vassart Gilbert (BE); Young Michael (BE)
FR2779153	New nucleotide sequences, useful for genetic identification of cattle.	Agronomique Inst Nat Rech (FR)
FR2779152	New nucleotide sequences, useful for genetic identification of cattle.	Agronomique Inst Nat Rech (FR)
WO9512607	Single nucleotide polymorphisms and their use in genetic analysis.	Molecular Tool Inc (US)
US2002012934	Business method for identification of a meat product by genotyping.	
EP1130114	Universal variable fragments.	Haeringen Lab B V Dr Van (NI)
US5955276	Compound microsatellite primers for the detection of genetic polymorphisms.	Du Pont (US)

Nº de patente	Título patente	Solicitante
US6294329	Use of primers for universal fingerprint analysis.	Max Planck Gesellschaft (US)
DE10014575	Identifying organisms by comparative genetic analysis, useful e.g. In foods and forensic testing, comprises genotyping regions of highly conserved genes.	Schackert Hans Konrad; Hahn Matthias; Goergens Heike (DE)
WO0107648	Method for the species-specific detection of organisms.	Krupp Guido; Scheinert Peter; Soeller Rainer; Spengler Ulrich; Artus Ges Fuer Molekularbiolog (DE)
WO9820166	DNA diagnostics based on mass spectrometry.	Den Boom Dirk Van (DE); Jurinke Christian (DE); Higgins G Scott (DE); Lough David M (GB); Siegert Carston W (US); Braun Andreas (US); Koster Hubert (US); Xiang Guobing (US); Fu Dong Jing (US); Little Daniel P (US); Sequenom Inc (US); Tang Kai (US); Damhoffer Demar Brigitte (US)
WO9629431	DNA diagnostics based on mass spectrometry.	Sequenom Inc (US)
US5885775	Methods for determining sequences information in polynucleotides using mass spectrometry.	Perceptive Biosystems Inc (US)
WO0055361	Method for identifying organisms by means of comparative genetic analysis and primers and hybridisation probes for carrying out this method.	Koufaki Olga Niki (DE); Schackert Hans Konrad (DE); Hahn Matthias (DE); Goergens Heike (DE)
EP0969102	Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting.	Keygene Nv (NI)
US5948649	Method for identifying nucleic acid sequences from different biological sources through amplification of the same.	Biotec Lab Limited (Gb)
US5902722	Method of detecting organisms in a sample.	Perkin Elmer Corp (US); Roche Diagnostic Systems Inc (US)
WO9854360	Methods for analyzing animal products.	Plastow Graham Stuart (Gb); Wales Richard (GB); Evans Gary Jon (GB); Pig Improvement Company Uk Lim (GB); Kijas James (SE); Andersson Leif (SE); Giuffra Elisabetta (SE)
US6183955	Methods for determining the coat color genotype of a pig.	Dalgety Plc (US)
WO9839475	A method and system of identification of a meat product by genotyping.	Bradley Daniel Gerard; Cunningham Edward Patrick; Loftus Ronan Thomas (Ie); Meghan Ciaran Niall; Machugh David Evan; Parlanca Limited (IE)

Nº de patente	Título patente	Solicitante
US5723597	Ribosomal nucleic acid probes for detecting organisms or groups of organisms.	Gen Probe Inc (US)
US5674687	Method for identifying the species origin of a DNA sample.	Cornell Res Foundation Inc (US)
WO9721835	Dna markers for shrimp selection.	Worcester Polytech Inst (US)
WO9401585	Method of selecting genetically superior shrimp.	Worcester Polytech Inst (US)
US5601984	Specific R-RNA subsequences as probes.	Gen Probe Inc (US)
US5595874	Nucleic acid probes for detection and/or quantitation of non-viral organisms.	Gen Probe Inc (US)
US5041371	Genetic marker for superior milk products in dairy cattle.	Wisconsin Alumni Res Found (US)
WO9319204	Bovine alleles and genetic markers and methods of testing of and using same.	Univ Illinois (US)
US6114118	Method of identification of animals resistant or susceptible to disease such as ruminant brucellosis, tuberculosis, paratuberculosis and salmonellosis.	Univ McGill (Ca); Texas A & M University Syst (US)
FR2795514	Complex molecule analysis process compares split molecule natural isotope abundance with reference sample.	
DE10105056	Method and kit for animal species-specific dna identification of a sample.	Congen Biotechnologie Gmbh (DE)
US6410227	DNA markers for litter size.	Dalgety Plc (GB)
JP2000325098	Identification of species of animal hair by dna.	Japan Synthetic Textile Inspection Inst Foundation
WO02064822 A	Method and kit for animal species-specific dna identification of a sample.	Congen Biotechnologie Gmbh; Kuhn Matthias; Mergemeier Steffen (DE)

**ANEXO IV:**

**PRODUCTOS TRANSGÉNICOS PENDIENTES DE APROBACIÓN EN LA UNIÓN EUROPEA**

Organismo modificado genéticamente	Empresa	Modificación genética	Fecha de recepción en la Comisión Europea
Maíz	Pioneer	gen Bt cryIA(b) (MON 809).	06.08.96
Nabo	Bejo-Zaden BV	Macho estéril.	18.12.98
Nabo	AgrEvo GmbH	Resistencia a glufosinato de amonio.	25.11.96
Nabo	AgrEvo GmbH	Macho estéril y resistencia a glufosinato de amonio.	19.05.98
Remolacha	DLF-Trifolium, Monsanto y Danisco Seed	Resistencia a glifosato.	23.06.98
Algodón	Monsanto	gen Bt cryIA(c) (línea 531).	14.07.98
Algodón	Monsanto	Resistencia a herbicida (línea 1445).	14.07.98
Patata	Amylogene	Composición de almidón modificada.	20.05.98
Nabo	AgrEvo GmbH	Resistencia a glufosinato de amonio (Liberator).	29.10.98
Maíz	Novartis	Resistencia a glufosinato de amonio y gen Bt cryIA(b) (Bt-11).	12.04.99 y 03.05.99 respectivamente
Maíz	Pioneer	Resistencia a glufosinato de amonio y gen Bt cryIA(b) (T25+MON810).	29.04.99
Maíz	Monsanto	Resistencia a glifosato (GA21).	20.05.99

Fuente: productos transgénicos pendientes de aprobación en La Unión Europea, bajo la Directiva 90/220/EEC, según datos procedentes de la Comisión Europea de octubre del 2001. The European Comisión, Food Safet, Authorisation. ([http://europa.eu.int/comm/food/fs/gmo/app\\_pond\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/gmo/app_pond_en.pdf)).

## 12. Referencias

- Aarts HJM, van Rie J-PPF & EJ Kok. (2002). Traceability of genetically modified organisms. Review. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2(1), 69-76
- Barometer ConsoFrance, LSA N°1710 - 15/02/01
- Bonfini, L.; Heinze, P.; Kay, S.; Van Den Eede, G. Review of GMO detection and quantification techniques. 2002, European Commission, JRC. Institute of Health and Consumer Protection.
- Bonfini, L.; Heinze, P.; Kay, S.; Van den Eede G. (2001). Review of GMO Detection and Quantification Techniques European Commission, JRC, Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, Italy.
- Brett, G. M., *et al.* (1999) Design and development of immunoassays for detection of proteins. *Food Control* 10, 401-406.
- Detsch, R. Species identification in meat products treated under different temperatures and heating conditions by means of polymerase chain reaction (PCR) in combination with restriction fragment length polymorphism (RFLP). 45th IcoMST 1999.
- European Commission. White Paper on food safety COM (1999) 719, 12th January 2000.
- Farid E. Ahmed (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*. Vol.20 No.5 May 215-223.
- Fernández Andrade, R. (2002). Trazabilidad alimentaria. Una herramienta decisiva para la seguridad y la protección de los consumidores. *Distribución y Consumo*. 5 Marzo-Abril.
- FGIS. Directive 9181.1. 26 de Febrero de 2001. Testing for StarLink Corn-Lateral Flow Test Strip Method.
- Gasch, A., *et al.* (1997). Detection of genetically modified organisms with the polymerase chain reaction: potential problems with food matrices. In *Foods Produced by Modern Genetic Engineering* (Schreiber, F.A. and Bögl, K.W., eds) 2nd Status Report, pp. 90-79, BgVV-hefte.
- Golan, E.; Krissoff, B.; Kuchler, F. Traceability for food marketing & food safety: what's the next step? *Agricultural Outlook*, Jan-Feb, 2002, 21-25.
- Hobbs, J. (2002). Study finds traceability has limited appeal for consumers. *Food Traceability Report*. Oct. 2002, 6-7
- Hold, G. L.; Russell, V. J.; Pryde, S. E.; Rehbein, H.; Quinteiro, J.; Vidal, R.; Rey-Méndez, M.; Sotelo, C. G.; Pérez-Martín, R. I.; Santos, A. T.; Rosa, C. Development of a DNA-Based Method aiming at identifying the fish species present in food products. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1175-1179.
- Hübner, P.; Studer, E.; Lüthy, J. (1999) Quantitation of genetically modified organisms in food. *Nature Biotechnology*. Vol 17 Nov.
- Hurburgh, C.; Roussel, S.; Hardy, C.; Rippke, G. (2002). Detection of Roundup-Ready Soybeans by Near-Infrared Spectroscopy. 93rd AOCS Annual Meeting & Expo Abstracts. Montreal, Québec, Canadá, May 5 - 8, 2002.
- Journal of AOAC International Vol. 84 no. 5, 2001.
- Jorgenson, B.; Larson, D.; Pape, W. R. (2002). Traceability – Cost Burden or Profit Opportunity?. *Food Traceability Report*. May 2002, 24.
- Kocher, *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1989) USA 86:6196-6200.
- Lipton, C. R., *et al.* (2000) Guidelines for the validation and use of immunoassays for determining of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. *Food Agric. Immunol.* 12, 153-164.
- Lockley, A. K.; Bardsley, R. G. (2002). Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. *Meat Science* 61 163 -168.
- Lockley, A. K.; Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* 11, 67-77.

- López, M.; Mallorquín, P.; Vega, M. (2002). Informe de Vigilancia Tecnológica : Microarrays y biochips de ADN. CIBT-FGUAM/ Genoma España.
- López Villar, J. GMO Contamination Around the World. Friends of the Earth International (2001).
- Lübeck, M. (2002). Detection of genetically modified plants - methods to sample and analyse GMO content in plants and plant products. Ministry of Environment. The Danish Forest and Nature Agency.
- Mackie, I. M., *et al.* (1999). Challenges in the identification of species of canned fish. Trends in Food Science and Technology 10 9-14.
- Meyer, R. (1999). Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. Food Control 10, 391-399.
- Mousavi, A.; Sarhadi, M.; Lenk, A.; Fawcett, S. (2002). Tracking and traceability in the meat processing industry: a solution. British Food Journal, Vol. 104 nº1, 7-19.
- Official Journal of the European Community, nº C71/06.
- Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directive 2000/13/EC as regards indication of the ingredients present in foodstuffs; Brussels, 06.09.2001; COM(2001) 433 final; 2001/0199 (COD).
- Rehbein, H.; Mackie, I. M.; Pryde, S.; Sotelo, C. G.; Pérez-Martín, R. I.; Quinteiro, J.; Rey-Méndez, M. (1999). Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: Validation by a collaborative study and investigation of inter-species variability of the DNA patterns. Food Chem 64(2): 263-268.
- Smajlovic, M. Reliability of ELISA methods in determining species of meat in heat-treated meat products. Veterinarski arhiv 70 (Suppl.) S67-73, 2000.
- Stull, D. (2001). A feat of fluorescence. Scientist 15, 20-21.
- Summary Report of A Joint Workshop Held in December 2000.
- Method Development In Relation To Regulatory Requirements for the Detection of GMOs In The Food Chain. ILSI Europe Novel Food Task Force, European Commission's Joint Research Centre (JRC) and ILSI International Food Biotechnology Committee Report Series. 2001 International Life Sciences Institute.
- The Independent, UK. G. Lean. 6 oct. 2002.
- Valenzuela, M. A. A comparative study of species identification by gel isoelectrofocusing, two dimensional gel electrophoresis and capillary zone electrophoresis. J. Cap. Elect. and Microchip Tech 006:85-91 1999.
- Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products. Eur. Food Res. Technol. (2001) 212: 385-389.
- Weder, J.; Rehbein, H. (2001). On the specificity of tuna-directed primers in PCR-SSCP analysis of fish and meat. Eur. Food Technol. 213: 139-144.
- Yates, K., ed. (1999). Detection Methods for Novel Foods Derived from Genetically Modified Organisms, ILSI Europe polymeric DNA and pedigree relationship in spring barley. Theor. Appl. Genet. 85, 976-984.

## Glosario de términos relacionados con la Trazabilidad

- **Amplificación:** producción de copias adicionales de una secuencia de DNA.
- **Anticuerpo:** sustancia defensora (proteína) sintetizada por el sistema inmunológico como respuesta a la presencia de una proteína extraña (antígeno).
- **Biochip de ADN:** matriz bidimensional de material genético que permite la automatización simultánea de miles de ensayos.
- **Desnaturalización:** destrucción irreversible de una macromolécula, por ejemplo la destrucción de una proteína por efecto del calor.
- **Electroforesis:** método empleado para separar una mezcla de moléculas grandes, tales como fragmentos de ADN o proteínas, haciendo pasar una corriente eléctrica a través de un gel que contiene las muestras que se desea separar.
- **Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA):** Inmunoensayo que usa anticuerpos específicos para detectar antígenos o anticuerpos en muestras biológicas. Los complejos que se forman se observan mediante enzimas asociados al anticuerpo, los cuales generan productos coloreados tras añadir un sustrato determinado.
- **Enzima de restricción:** tipo de enzima que corta el ADN por donde encuentra una secuencia específica de entre cuatro y seis bases.
- **Fragmentos de restricción:** segmentos de ADN obtenidos mediante cortes generados con enzimas de restricción.
- **Genómica:** estudio del conjunto completo de genes de un organismo.
- **Hibridación:** formación natural o construcción artificial de una molécula de ácido nucleico dúplex por apareamiento de bases complementarias entre dos cadenas de ácido nucleico procedentes de distintas fuentes.
- **Intrón:** fragmento no codificante de un gen que no es traducido a proteína.
- **Organismo clónico:** organismo o grupo de organismos que proviene de otro organismo o célula mediante reproducción asexual, y que resulta idéntico al organismo original.
- **Organismo Modificado Genéticamente o transgénico (OMG):** organismo que se caracteriza por contener una fracción de ADN de otro organismo integrado en su propio ADN. Como resultado, el organismo transgénico adquiere una nueva función generalmente de interés comercial.
- **Patrón especie-específico:** patrón biológico único para cada especie.
- **Polimorfismo:** múltiples variantes de un mismo gen.
- **Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs):** variaciones de las longitudes de los fragmentos de restricción (producidos por cortes con enzimas de restricción) debidas a la presencia de mutaciones que alteran las dianas de las enzimas de restricción haciéndolas no reconocibles.
- **Primer o cebador:** pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN.
- **Proteómica:** estudio del total de moléculas proteicas presentes en una célula, tejido u órgano.
- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** método empleado para amplificar una secuencia específica de ADN in vitro mediante ciclos repetidos de síntesis, usando cebadores específicos y ADN polimerasa.
- **Secuenciación de ADN:** determinación del orden de nucleótidos o bases en una muestra pura de moléculas de ADN.
- **Southern Blot:** hibridación de una cadena sencilla de ácido nucleico (ADN o ARN) con fragmentos de ADN inmovilizados en un filtro.
- **Trazabilidad o rastreabilidad:** habilidad utilizada para identificar el origen de un alimento o de sus productos, tan lejos en la secuencia de producción como sea necesario, y realizar un seguimiento del mismo a lo largo de toda o parte de su vida útil.
- **Western Blot:** detección de proteínas inmovilizadas sobre un filtro mediante la reacción complementaria con un anticuerpo específico.



madriod

# Genoma España



Rosario Pino, 14-16, planta 7 - 28020 Madrid  
Teléfono: 91 449 12 50 • Fax: 91 571 54 89  
[www.gen-es.org](http://www.gen-es.org)



ESTEVE